

08/894 356

PCT/JI-96/00348

27.03.96

22/8  
401

# 日 本 国 特 許 庁

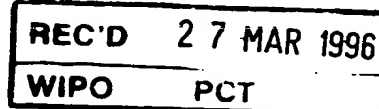
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年 1月30日



出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第046534号

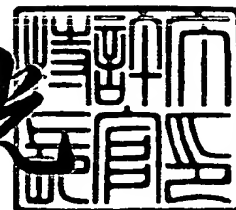
出 願 人  
Applicant (s):

サントリー株式会社

1996年 7月19日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平08-3032581

【書類名】 特許願

【整理番号】 P96-0003

【提出日】 平成 8年 1月30日

【あて先】 特許庁長官 清川 佑二 殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 アシル基転移酵素をコードする遺伝子

【請求項の数】 16

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 芦刈 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 田中 良和

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 藤原 裕之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 中尾 正宏

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 福井 祐子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー

株式会社 基礎研究所内

【氏名】 米倉 圭子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 水谷 正子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 久住 高章

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【郵便番号】 530

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代表者】 鳥井 信一郎

【電話番号】 06-346-1131

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第 67159号

【出願日】 平成 7年 2月17日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第196915号

【出願日】 平成 7年 6月29日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

【請求項2】 配列番号1において塩基配列番号21～1412の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号2において塩基配列番号35～1471の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項4】 配列番号3において塩基配列番号67～1410の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項5】 配列番号4において塩基配列番号3～1340の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項6】 配列番号5において塩基配列番号3～1364の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項7】 請求項1ないし6のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有し、芳香族アシル基転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項8】 植物体の粗酵素抽出液をシバクロンブルー3GAを固定した樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィー処理により得られる芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質。

【請求項9】 植物体の粗酵素抽出液をシバクロンブルー3GAを固定した樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィー処理による芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質の単離方法。

【請求項10】 芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質の製造方法において、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなる発現ベクターにより形質転換された宿主を培養し、該培養物から前記蛋白質を採取することを特徴とする方法。

【請求項11】 植物体内における色素のアシル化方法において、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、導入する植物において適



当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化を行うことを特徴とする方法。

【請求項12】 色素がアントシアニンである請求項11記載の植物体内における色素のアシル化方法。

【請求項13】 植物体内における色素の安定化方法において、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応が行われることにより当該色素が安定化されることを特徴とする方法。

【請求項14】 色素がアントシアニンである請求項13記載の植物体内における色素の安定化方法。

【請求項15】 植物の花色調節方法において、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応によって当該色素が安定化されることにより植物の花色を目的の花色に調節することを特徴とする方法。

【請求項16】 色素がアントシアニンである請求項15記載の植物の花色調節方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物由来の芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。更に詳しくは、リンドウ (Gentiana triflora var. japonica)、ペチュニア (Petunia hybrida)、シソ (Perilla ocimoides) 及びサイネリア (Senecio cruentus) 由来の芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

花産業は新規かつ種々の品種を開発することに努力している。新規な品種の育成のための有効な方法の一つとして花の色を変えることがあり、古典的な育種方法を用いて、ほとんどの商業的品種について広範囲な色を作出することに成功している。しかしながら、この方法では種ごとで遺伝子プールが制限されていることから、単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することは稀である。

## 【0003】

花の色は主として2つのタイプの色素、即ちフラボノイド及びカロチノイドに基づき、フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与し、カロチノイドはオレンジ又は黄色の色調に寄与する。花色に主たる寄与をするフラボノイド分子はシアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びペラルゴニジンの配糖体であるアントシアンであり、異なるアントシアンが顕著な花の色の変化をもたらす。さらに花の色は無色のフラボノイドの補助発色、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液胞のpHにより影響される (Forkmann, Plant Breeding 106:1, 1991)。

## 【0004】

アシル化されたアントシアンは、サイネリア (Senecio cruentus) 由来のシネラリン (Goto et al., Tetrahedron 25:6021, 1984)、ツユクサ (Commelina communis) 由来のアオバニン (Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:17, 1991) 及びオヤマリンドウ (Gentiana Makinoi) 由来のゲンチオデルフィン (Yoshida et al., Tetrahedron 48:4313, 1992) を始め、自然界からの数多くの分離例が報告されている (タイマツバナ: Kondo et al., Tetrahedron 26:5879, 1985; シソ、パンジー: Goto et al., Tetrahedron 27:2413, 1987; シマフムラサキツユクサ: Idaka et al., Tetrahedron 28:1901, 1987; ヤマノイモ: Shoyama et al., Phytochemistry 29:2999, 1990; アカキヤベツ、キキヨウ、ロベリア、ラークスパー、チヨウマメ: Goto and Kondo, An

gew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:17, 1991; ニンジン: Glabgen et al., Phytochemistry 31:1593, 1992; アサガオ: Lu et al., Pytochemistry 32:659, 1992; キランソウ、トウバナ、オドリコソウ、ラベンダー、イヌハッカ、オオキセワタ、プレクトランサス、ウツボグサ、ヒゴロモソウ、ネジリイモ: Saito and Harborne, Phytochemistry 31:3009, 1992; オオオニバス: Strack et al., Phytochemistry 31:989, 1992; カンパニュラ: Brandt et al., 33:209, 1993)。

【0005】

これらのアントシアンを含むフラボノイドを修飾するアシル基は構造的に2種類に分けられる。一つはハイドロキシ桂皮酸を中心とする芳香族アシル基であり、もう一つはマロニル基のような脂肪族アシル基である。これらのアシル基転移反応のうち、グルコースを介して芳香族アシル基、好ましくはクマル酸やコーヒー酸が結合したアントシアンはその吸収極大が長波長側に移動することがアサガオ (Pharbitis nil) のアントシアン系色素を用いた実験により観察された (Dangle et al. Phytochemistry 34:1119, 1993)。

【0006】

さらに、サイネリア (Senecio cruentus) 由来のシネラリンは1個の脂肪族アシル基と3個の芳香族アシル基を有するが、シネラリンからの芳香族アシル基の解離により、中性の水溶液中で色素の安定性が低下することが報告されている

(Goto et al., Tetrahedron 25: 6021, 1984)。また、リンドウ (Gentianamakinoi) に由来するゲンチオデルフィンはその分子内に存在する2つの芳香族アシル基により、サンドイッチ型の分子内スタッキングが起こり、水溶液中で色素が安定化されることが報告されている (Yoshida et al., Tetrahedron 48:4313, 1992)。さらに、吉田らは、リンドウのアントシアニンにはアントシ

アニンの5位のグルコースと3'位のグルコースのそれぞれにアシル基が結合していることを明らかにした (Tetrahedron 48, 4313, 1992)。また、シソ (Perilla ocimoides) の葉のアントシアニン  
はシアニジン3, 5-ジグルコシドの3位のグルコースにクマール酸が結合した  
シソニンであることも報告されている (Tetrahedron Letters 27, 2413-2416, 1978)。

【0007】

しかしながら、これらの研究は有機化学的側面から天然色素の構造学的研究においてなされており、アシル基を転移する酵素を単離するなどの生化学的側面からの研究はなされていない。

【0008】

また、植物におけるアントシアン系色素へのアシル基転移酵素のうち、脂肪族アシルであるマロニル基転移酵素についてはパセリの培養細胞 (Matern et al., Arch. Biochem. Biophys. 208:233, 1981; Matern et al., Arch. Biochem. Biophys. 226:206, 1983; Matern et al., Eur. J. Biochem. 133:439, 1983) や Cicer arietinum の実生 (Koster et al., Arch. Biochem. Biophys. 234:513, 1984) からのものを始めとして多くの報告が為されている。

【0009】

また、芳香族アシル基転移反応は1980年にナデシコ科の植物である Silene (Kamsteeg et al., Biochem. Physiol. Pflanzen 175:403, 1980) で初めて示され、Matthiola の可溶化酵素画分にも同様の芳香族アシル基転移酵素活性が見い出されている (Teusch et al., Phytochemistry 26:991, 1986)。

【0010】

しかしながら、これらの報告では酵素活性の存在を示したのみに留まっており

、対応する酵素蛋白質を特定したり、その一次構造やさらにはそれをコードする遺伝子についてはなんら知見が得られていない。それ以外の芳香族アシル基転移酵素についても蛋白質や遺伝子の一次構造を明らかにした報告はなく、さらにこのアントシアン系色素のアシル化反応を花色幅の拡大に積極的に利用して花を育種した例や、アシル化を用いてアントシアンの安定化をはかった報告もない。

【0011】

一方、ペチュニア (Petunia hybrida) のアントシアニンの生合成経路はよく研究されており (Wiering, H. and de Vlamming, P. Inheritance and biochemistry of pigments. *Petunia*, P49-65, (1984)、Griesbach, R. J., asen, S. and Leonhardt, B. A., *Phytochemistry*, 30, 1729-1731, 1991)、アシル基を含むアントシアニンが存在することが知られている。ペチュニアのアントシアニンのアシル基はクマル酸あるいはカフェ酸が知られており、アントシアニンの3位のルチノシドに一分子のクマル酸又はカフェ酸が結合していて、化学構造はアントシアニンがマルビジンの場合、それぞれ3-0-(6-0-(4-0-クマロイル)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル)-5-0- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジン、3-0-(6-0-(4-0-カフェオイル)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル)-5-0- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジンであるとされていた。しかし、アシル基を2つ持つアントシアニンについての報告例はなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物由来の芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。即ち、当該利用に関しては、植物において、フラボノイド、好ましくはアントシアンへのアシル基転移反応を制御する方法が挙げられ、それにより単一種が広範囲の花色を発現する可能性を提供する。特に、芳香族アシル基の転移により、アントシアンの吸収極大が長波長側に移動することから、既存の花色に青味を持たす場合に有効であると考えられる。

## 【0013】

これらの技術を実現化させるためには芳香族アシル基転移反応をつかさどる酵素を明らかにし、その酵素をコードするcDNAを分離する必要がある。更に、一つのアシル基転移酵素のcDNAから遺伝子の相同性を利用して他のアシル基転移酵素遺伝子の分離が可能となる。また、アシル化によりアントシアンの安定性が増すことから、安定なアントシアン色素の生産も可能となる。

## 【0014】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、リンドウの花弁からアシル基転移酵素を精製し、その一次構造を決定した。更には、遺伝子組換え技術を用いてリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリアのアシル基転移酵素のcDNAを単離し、構造遺伝子の塩基配列を決定した。即ち、本発明はリンドウ、ペチュニア、サイネリアの花弁及びシソの葉に存在するアシル基転移酵素をコードしているDNA配列を提供するものである。また、本発明に係る酵素を用いてアントシアン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアンの安定性を増すことができる。

## 【0015】

アシル基転移酵素をコードする遺伝子は例えば次のようにして得ることが出来る。即ち、まず、リンドウの花弁よりアシル基転移酵素を精製する。従来、本発明が成される以前に、芳香族アシル基転移酵素の精製に成功した例はなく、本発明者らは各種のクロマトグラフィー法、特にシバクロンブルー3GA (Cibacron Blue 3GA) を固定した樹脂 (例えば、ブルーセファロース (登録商標) 樹脂等) を用いたアフィニティークロマトグラフィー法を行うことにより初めて当該酵素の精製に成功した。

次に、常法に従ってアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列を解明し、それらのアミノ酸配列に対応する合成ヌクレオチドを作製する。

## 【0016】

一方、同じリンドウの花弁よりpoly A+RNAを抽出し、常法により、2本鎖cDNAを合成し、更にcDNAライブラリーを作製する。前述の2本鎖cDNAを鋳型にし、前述の合成DNAとcDNAを合成する際に使用した合成

DNAプライマーを用い、PCR法により、アシル基転移酵素遺伝子に特異的なDNA断片を取得する。次に、このDNA断片をプローブにして、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを得る。そして、このクローンから回収されるプラスミドDNAを分離し、DNA塩基配列を決定する。更に精製したアシル基転移酵素の分析により得られたアミノ酸配列とDNA塩基配列から推定したアシル基転移酵素のアミノ酸配列とを比較することにより、陽性クローンが求めるcDNAクローンであることを確認する。

【0017】

また、このクローンを大腸菌及び酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がアシル基転移酵素をコードしていることを確認し、アシル基転移酵素遺伝子の翻訳領域を明らかにすることにより本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子が得られ、更に、当該遺伝子を発現させることにより遺伝子産物である目的のアシル基転移酵素蛋白を得ることができる。

【0018】

また、本発明者らは、ペチュニア品種サフィニアパープル（サントリー（株））の花色が通常の赤紫から紫に変化した変異株（VM）を見だし、アントシアニンの構造決定を、例えば吉田らの文献（Yoshida et al., Tetrahedron 48; 4313, 1992）に記載の方法に従って行った。

【0019】

なお、本明細書においてはリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素について述べているが、当該酵素の精製法をそのまま又は一部を改変して、他の植物のアシル基転移酵素を精製し、当該酵素に係るアミノ酸配列を決定することにより、当該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることができる。更に、本発明に係るリンドウ由来のアシル基転移酵素のcDNAをプローブとして用いることにより、リンドウから別のアシル基転移酵素のcDNA）ペチュニアから別のアシル基転移酵素のcDNAを得ることができた。従って、アシル基転移酵素の遺伝子の一部または全部を用いると、他のアシル基転移酵素遺伝子を得ることができる。また、これらのアミノ酸配列を比較したところ、保

存されているアミノ酸配列があった。この領域を用いて、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素のcDNAを得ることに成功したが同様の手法を用いることにより、他の植物に応用し、類似のアシル基転移酵素のcDNA又は染色体DNAクローンを得ることが可能である。

#### 【0020】

また、本明細書において示したように、リンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素を精製し、常法に従って当該酵素に対する抗体を得ることにより、その抗体と反応する蛋白質を作るcDNA又は染色体DNAをクローニングすることができる。従って、本発明はリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素の遺伝子のみに限定されるものではなく、広く芳香族アシル基転移酵素に関するものである。

#### 【0021】

また、本明細書においてはアントシアンを含むフラボノイドのアシル基転移反応において、アシル基の供与体としてp-クマロイル-CoA又はカフェオイル-CoA等のCoAエステルを挙げたが、p-クマロイル、フェルロイル又はシナポイル-1-O-グルコースといったヒドロキシシナモイル-1-O-グルコースも芳香族アシル基の供与体としての利用が可能であるので(Glassgen and Seitz, Planta 186: 582, 1992)、本発明に係る酵素を用いた利用が可能である。

#### 【0022】

##### 【実施例】

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。実験の手順は特に記述しない限り SambrookらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従った。

##### 実施例1 植物からのアシル基転移酵素の検索

###### (1) 基質の調製

デルフィニジン3, 5-ジグルコシドおよびシアニジン3, 5-ジグルコシドはバーベナ (V. c. r. b. e. n. a. h. y. b. r. i. d. a.) の一品種であるタピアンバイオ



レット（サントリー（株）より購入可能）の花弁からそれぞれのジアセチル体を抽出し、脱アセチル化することにより取得した。タピアンバイオレットの花弁（348 g）を液体窒素とともにホモジナイザーで摩砕し、50%（v/v）アセトニトリル、0.2%トリフルオロ酢酸（TFA）溶液1.5 Lに浸して3日間放置した。

【0023】

濾紙上にケイソウ土（#100）を敷き詰めて吸引ろ過し、ロータリーエバポレーターで約半分量に濃縮して、HP-20（ファルマシア社）にて、ゲル濾過を行った。800 mlの蒸留水で洗浄後、50%アセトニトリル、0.1% TFA 800 mlで色素画分を溶出した。エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して、粗色素（7.3 g）を得た。

【0024】

タピアンの主色素はデルフィニジン及びシアニジンの3, 5-ジアセチルグルコシドであるため、以下の脱アセチル化操作を行った。粗色素1 gをメタノール50 mlに溶解し、窒素ガスを15分間通気して溶存酸素を除いた後、氷冷した。

【0025】

一方で、1 N水酸化ナトリウム50 mlから同様に溶存酸素を除き、氷冷下で先の色素溶液に攪拌しながら滴下し、更に30分間攪拌して加水分解反応をさせた。6 N塩酸1 mlを加えて反応を停止させ、蒸留水5 mlを加えてエバポレーターで約半量に濃縮し、終濃度10%になるようにメタノールを加えて2 mlずつSep Pac C18カラム（ウォーターズ アソシエーション社）にアプライし、蒸留水5 mlで洗浄した後、30%アセトニトリル、0.6% TFA 2 mlで溶出させた。

【0026】

溶出液をすべて集めてエバポレーターで濃縮し、HPLCによる分取を行った。

DEVELO SIL ODS-10/20（50×300 mm；野村化学（株））カラムを用い、120分間でTFAが0.1%から0.3%、アセトニトリル

が10%から30%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.5分毎に分取し、各画分の色素画分の吸収スペクトルを測定して、デルフィニジン3, 5-ジグルコシドおよびシアニジン3, 5-ジグルコシドを分離してそれぞれを濃縮、凍結乾燥した（デルフィニジン3, 5-ジグルコシド 75mg、シアニジン3, 5-ジグルコシド 50mg）。各々を1.5mg/mlになるように0.5% TFAに溶解して、使用するまで-80℃に保存した。

【0027】

もう一方の基質であるヒドロキシシンナモイル-CoAの合成は以下の方法で行った。最初に、文献（Stockigt and Zenk, Z. Naturforsch. 30:352, 1975）に従ってカフェ酸（ナカライテスク社）とN-ヒドロキシスクシンイミド（メルク（Merck）社）よりエステルを合成した。このエステル0.5mmolを2mlのアセトンに溶解し、一方でコエンザイムA（CoA: KOHJIN）0.1mmolと炭酸水素ナトリウム1mmolとを20mlの水に溶解して、これに先のエステル溶液を1滴ずつ加えた。

【0028】

攪拌しながら窒素ガスの下で室温で一晩反応させた後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、遠心（27000×g、10分）によって不溶物を除いて、HPLCで目的の生成物を分取した。DEVELO SIL ODS-10/20（50×300mm；野村化学（株））カラムを用い、0.1% TFA存在下でアセトニトリルが40分間で18%から36%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.8分毎に分取し、各画分の吸光スペクトル（200～400nm）を調べて344～348nmに極大吸収を持つ画分をカフェオイルCoA画分として集めた。それらをロータリーエバポレーターで濃縮した後、同じカラムで再び分離した。

【0029】

但し、アセトニトリル18%、TFA0.1%の等濃度クロマトグラフィーで分離を行い、同様に吸光スペクトルを調べて、目的の化合物を含む画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。この方法で35μmolの生成物

が得られた。また、上記の方法中カフェ酸のかわりにクマル酸を用いることにより  $p$ -クマロイル-CoA が合成でき  $2 \text{ mg/ml}$  になるように蒸留水に溶解して、使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  に保存した。

【0030】

### (2) 粗酵素液の抽出方法

酵素を抽出する植物組織（花卉や食用部分等） $3 \text{ g}$  を液体窒素で凍結させて乳鉢上で磨砕した。 $10 \text{ ml}$  の抽出用緩衝液（ $100 \text{ mM}$  リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.5$ ）、 $10 \text{ mM}$  アスコルビン酸ナトリウム、 $14 \text{ mM}$  2-メルカプトエタノール）を加えて更に磨砕し、ガーゼ3層で濾過した。DOWEX（1-X2、 $100-200 \text{ mesh}$ ；室町化学工業（株）） $3 \text{ g}$  を添加して10分間攪拌した後に吸引ろ過によって樹脂を除去し、遠心分離（ $27000 \times g$ 、20分）によって植物体残渣を除いた。 $70\%$  飽和硫酸で塩析を行い、タンパク質を沈殿させた。沈殿を  $1 \text{ ml}$  の溶解用緩衝液（ $20 \text{ mM}$  リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.5$ ）、 $14 \text{ mM}$  2-メルカプトエタノール）に懸濁し、遠心分離（ $27000 \times g$ 、5分）によって不溶物を除去した後、溶解用緩衝液で平衡化させた Sephadex G-25 カラム（NAP-10；ファルマシア社）を用いて脱塩した溶液を粗酵素液として用いた。

【0031】

### (3) 酵素活性の測定方法

$100 \text{ mM}$  リン酸緩衝液（ $\text{pH } 8.5$ ）、デルフィニジン3，5-ジグルコシド  $24 \text{ nmol}$ 、カフェオイル-CoA  $21.5 \text{ nmol}$ 、及び酵素液  $20 \mu\text{l}$  を含む反応液  $50 \mu\text{l}$  を  $30^\circ\text{C}$  で10分間反応させた。 $13.8\%$ （ $v/v$ ）酢酸を含むアセトニトリル  $50 \mu\text{l}$  を加えて反応を停止させ、遠心分離（ $18000 \times g$ 、5分）によって不溶物を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。分析はC18逆相カラム（YMC-Pack ODS-A、 $6.0 \times 150 \text{ mm}$ ；ワイエムシ社）を用い、 $21.6\%$  アセトニトリル、 $0.1\%$  トリフルオロ酢酸を毎分  $1 \text{ ml}$  の流速で流し、反応液  $20 \mu\text{l}$  を分析した。化合物の検出には三次元クロマトグラフィーシステム（CLASS-LC10；（株）島津製作所）を使用し、生成物は、基質にはない  $330 \text{ nm}$  付近に

極大吸収をもつこと、及び可視部の吸収極大値が519 nmから525 nmへと約6 nm長波長側に移動していることから、アシル基（カフェ酸）が結合し、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドが生成していることを確認した。

#### 【0032】

520 nmの波長で検出し、基質（デルフィニジン3，5-ジグルコシド）と生成物（デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド）とのピーク面積の和に対する生成物のピーク面積の比を求め、生成物のモル数を計算して酵素活性（kat）とした。このHPLC分析における各化合物の展開時間は次の通りである。カフェオイル-CoA：6.3分、デルフィニジン3，5-ジグルコシド：3.3分、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド：5.3分。

#### 【0033】

但し、この反応条件下においては反応液中のデルフィニジン3，5-ジグルコシドがアシル基転移酵素により、カフェ酸で修飾されることにより、反応液の色が濃青色から赤紫色に変化するため、簡便な方法として、マイクロタイタープレート中にて反応を行い、色の変化によって酵素活性を調べることができる。

なお、反応後のプレートを室温で長期間（1日～1週間）放置すると、アシル化されていないデルフィニジン3，5-ジグルコシドは無色化するのに対して、酵素の働きによってアシル化されたデルフィニジン3，5-ジグルコシドでは赤紫色が残ることから、デルフィニジン3，5-ジグルコシドがアシル化されることによって中性からアルカリ性の水溶液中での安定化が認められた。同様にシアニジン3，5-ジグルコシドを基質とした場合も反応液の色が赤紫色から濃青色に変化し、色素が安定化することから、簡易的酵素アッセイ方法での酵素活性の検出が可能である。

#### 【0034】

一方、カフェオイル-CoAのかわりにp-クマロイル-CoAを基質とした場合もアシル化による色の変化及びアントシアニンの安定化が認められるが、色調の変化の度合いはカフェオイル-CoAの場合に比べ少ない。

【0035】

(4) アシル基転移酵素の検索

各種の植物（リンドウ、アイリス、デルフィウム、ストック、トルコキキョウ、ナデシコ、スイーピー、ラークスパー、パンジー（以上、花卉）、赤キャベツ、赤タマネギ、金時ニンジン、西洋ニンジン、ムラサキイモ（以上、食用部分）及びナス（果実上皮部分））から上記の方法によって粗酵素液を抽出し、酵素活性を測定したところ、トルコキキョ、ナデシコ及び、リンドウに各々0.63、0.0012及び21.8 nkat/mg蛋白質のアシル基転移活性が認められた。抽出タンパク質当たりのアシル基転移酵素活性が最も高いリンドウを酵素精製の材料として用いることにした。

なお、タンパク質濃度の定量にはBio-Rad Protein Assay (Bio-Rad社)を用いた。

【0036】

実施例2 リンドウ由来のアシル基転移酵素の精製

(1) 酵素の精製

エゾリンドウ (Gentiana triflora var. japonica) の花卉から酵素の精製を行った。以下の実験は記載がない限り、0~4℃で行った。エゾリンドウの花弁3kgを液体窒素存在下でエクセル・オート・ホモジナイザー (DX-3; 日本精機製作所) を用い磨砕した。8Lの抽出用緩衝液 (100mM トリス塩酸 (pH 7.0)、1mM アスコルビン酸ナトリウム、10mM p-アミジノフェニルフッ化メタンスルフォル塩酸塩 (p-APMSF; 和光純薬工業 (株))、5mM ジチオスレイトール (DTT; ナカライテスク社)) とポリクラールSB-100 (和光純薬工業 (株)) 500を加えてポリトロンで完全に粉砕した。

【0037】

粉砕液をガーゼ4層で搾ったのち、さらに遠心分離 (11000×g、30分) して細胞残渣を除去した。40%飽和硫酸で塩析を行い、不溶物を除去した後に70%飽和硫酸で再び塩析を行った。沈殿を250mlの溶解用緩衝液 (20mM トリス塩酸 (pH 7.0)、10mM p-APMSF、1mM DTT) に

懸濁し、遠心分離によって不溶物を除去した後、同緩衝液で平衡化させた Sephadex G-25 (95×110 mm; ファルマシア社) のカラムを用いて脱塩した。蛋白質を含む画分を集め (860 ml)、以下のクロマトグラフィーに供した。

なお、Q-Sepharose Fast Flow、HiTrap Blue 及び Phenyl Superose の各クロマトグラフィーは室温で FPLC システム (ファルマシア社) を用いて行った。

#### 【0038】

まず、溶解用緩衝液で平衡化させた Q-Sepharose Fast Flow (26×100 mm; ファルマシア社) にアプライし、同じ緩衝液で十分に洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を 60 分間で 0 M から 0.4 M に変化させる直線勾配により溶出させた (8 ml/min)。酵素活性のある画分を集めた (130 ml) 後、アフィニティクロマトグラフィーを行った。溶解用緩衝液で平衡化させた HiTrap Blue (5 ml, 1.6×25 mm; ファルマシア社) を 3 本直列に繋いだカラムにアプライし、同緩衝液で十分に洗浄した後、1 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出させた。活性画分を 70% 飽和の硫酸で塩析し、蛋白質の沈殿を得た。

#### 【0039】

この沈殿物を 1 ml の溶解用緩衝液に懸濁して遠心分離によって不溶物を除いた後、溶解用緩衝液で平衡化させた Sephacryl S-200 (25×1150 mm; ファルマシア社) にアプライした。毎分 0.2 ml の流速で、約 3 ml ずつ分取し、再び活性画分を集めて (27 ml)、1 M になるように硫酸を加えた。十分に攪拌した後、遠心分離 (39000×g、10 分) により不溶物を除去し、1 M 硫酸を含む溶解用緩衝液で平衡化させた Phenyl Superose 5/5 (5.0×50 mm; ファルマシア社) にアプライした。

#### 【0040】

毎分 0.5 ml の流速で、十分に洗浄した後、硫酸濃度を 60 分間で 1 M から 0 M に直線的に下げることにより蛋白質を流出させた。0.5 ml ずつ分取した各画分の酵素活性を測定し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (10%ア

クリルアミドゲル；第一化学（株））で分析した結果、ほぼ単一の蛋白質として分子量約50,000のバンドが認められ、且つこの蛋白量と活性との相関が認められることから、この蛋白質が目的のアシル基転移酵素であると断定した。更に単一標品を得るために活性を持つ画分（12ml）を逆相HPLCにより精製した。

#### 【0041】

カラムはDEVELO SIL 300C4-HG-5（4.6×250mm；野村化学（株））を用い、毎分1mlの流速で、トリフルオロ酢酸0.1%存在下、30分でアセトニトリル濃度を40.5%から56.7%の直線濃度勾配で変化させることにより溶出させた。280nmの吸収をモニターしながら1mlずつ分画し、さらに各画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析して分子量約50,000の蛋白質を含む画分を集めた。このHPLC操作を30回繰り返し、スピードバック（サバント社）で濃縮することにより約0.2mgの単一蛋白質標品を得ることができた。

#### 【0042】

##### （2）精製蛋白質の分析

500pmolの精製標品をアミノ酸シーケンサー（PSQ-1；（株）島津製作所）に供したところ、エドマン分解の第一段目で200pmolのグルタミン酸、更に第二段でも90pmolのグルタミン酸が検出されたが、三段目以降は判読不能であったため、本酵素のN末端は何らかの形でブロックされていると考えられた。

#### 【0043】

しかしながら、N末端がグルタミン酸である場合にはピログルタミル基が生じ、エドマン分解によるシーケンスでは上述のような結果を示すことが知られていることから本酵素のN末端はグルタミン酸である可能性が高い。

#### 【0044】

残りの沈殿を80μlの45mMトリス塩酸（pH8.5）、3.6M尿素、0.09%SDSを含む溶液に溶解し、リシルエンドペプチダーゼ（Lysyl Endopeptidase：Achromobacter lyticus由

来；和光純薬工業（株））16 pmolを加えて、37℃で6時間反応させた。  
反応液をそのままDEVELO SIL 300C4-HG-5カラムで分離した。

【0045】

分離条件は、0.1%トリフルオロ酢酸のもと、70分でアセトニトリル濃度が0%から80%の直線濃度勾配、毎分0.7mlの流速で、210nmの吸収をモニターしながら吸収のピーク画分のみを分取した。得られた13本のピーク画分のうち、アセトニトリル濃度が32%から40%の時点で溶出されたピーク画分の3本を、スピードバックによる濃縮後、さらにODSカラム（DEVELO SIL 3000DS-HG-5；野村化学（株））を用い、先と同じ条件で分離及び精製を行った。

【0046】

各ピーク画分をスピードバックで濃縮・乾固させ、40%アセトニトリル30μlに溶解させ、アミノ酸シーケンサーに供した。その結果6本のペプチドのアミノ酸配列を判読することができた。以下に、各々のペプチドのアミノ酸配列を示す（アミノ末端からカルボキシル末端の方向に示す）。

【0047】

アミノ酸配列（AT73）；

【化1】

Arg-Phe-Leu-Gly-Ile-Thr-Gly-Ser-Pro-Lys

【0048】

アミノ酸配列（AT72）；

【化2】

Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

【0049】

アミノ酸配列（AT741-1）；

【化3】

Gly-Val-Glu-Ile-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Lys

【0050】



アミノ酸配列 (AT 741-2) ;

【化4】

Ala-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Leu-Lys

【0051】

アミノ酸配列 (AT 9) ;

【化5】

His-Tyr-Val-Pro-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Leu-Met-Pro-Ile-Lys

【0052】

アミノ酸配列 (AT 83) ;

【化6】

Val-Arg-Ala-Thr-Tyr-Val-Leu-Ser-Leu-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys

【0053】

実施例3 リンドウ由来のアシル基転移酵素のcDNAクローニング(1)

(1) cDNAライブラリーの作製

市販されているリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) から花卉を集め、液体窒素中で乳鉢で磨砕した。この磨砕物から、グアニジンチオシアネート/塩化セシウムを用いる方法によりRNAを得、オリゴテックス (日本ロッシュ) を用い、製造者が推奨する方法にて、poly A+RNAを得た。グアニジンチオシアネート/塩化セシウムを用いる方法は、R. McGookin, Robert J. Slaterらの、*Methods in Molecular Biology* vol 2, (Humana Press Inc. 1984) に詳細に示されている方法に従った。

【0054】

得られたpoly A+RNAを鋳型とし、ZAP-cDNA合成キット (ストラタジーン社製) を用いて2本鎖cDNAを合成し、ファージベクターλZAPIIへのクローニングを行った。更に、同社のGigapackII Gold Packaging Extractキットを用いて、当該キットに記載された方法でcDNAライブラリーを作製した。

【0055】

(2) 合成DNAプライマーの設計

実施例2で得られた部分アミノ酸配列のうち、

【0056】

【化7】

**Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys**

で示される配列は、リジルエンドペプチダーゼの特異性を考えると、

【0057】

【化8】

**Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys**

であると考えられる。この配列の中の

【0058】

アミノ酸配列；

【化9】

**Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala**

で示される部分を用いて、以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0059】

ヌクレオチドの配列（オリゴ1）；

【化10】

**5'-AARATMCAHATGGAYGCITTYGC-3'**

【0060】

但し、特に記載のないかぎり、核酸の配列はIUPAC-IUB準拠の核酸コード表に従って一文字で表記する。即ち、A：アデニン、C：シトシン、G：グアニン、T：チミン、Y：C又はT、R：A又はG、M：A又はC、H：A又はC又はT、及びIはイノシンを示す。

また、先に述べたcDNAライブラリー作製時に使用したプライマーをもとに以下の他のオリゴヌクレオチドも合成した。

【0061】

ヌクレオチドの配列（オリゴ2）；

【化11】

5'-CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTT-3'

【0062】

(3) アシル基転移酵素遺伝子断片のクローニング

リンドウの花弁のRNAに由来する2本鎖cDNA約0.1  $\mu$ gを鋳型にオリゴ1とオリゴ2をプライマーとして、PCR反応を行った。反応はポリメラーゼチェーン反応キットGene Amp (宝酒造(株))を用いて、95℃1分、45℃1分、72℃2分を1サイクルとし、35サイクル行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約400bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、その10ngをDIG-ヌクレオチド混合液(ベーリンガー社)と合成ヌクレオチドIとIIを用いて、前述のPCR反応を25サイクル行い、DIGで標識したDNA断片を得た。

【0063】

(4) アシル基転移酵素のcDNAのクローニング

上記のようにして得られた $\lambda$ ファージライブラリーを大腸菌XL1-Blue株(ストラタジーン社)に感染させ、1プレート当りプラーク5万個を含む5枚のプレート(直径13.5cm)をスクリーニングした。

【0064】

ファージをフィルター(Hybond N+, アマーシャム社)に吸着させ、製造者の推奨する方法で処理した後、このフィルターをハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC、50%ホルムアミド、50mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)、7%SDS、2%Blocking reagent(ベーリンガー社)、0.1%ラウロイルサルコシン、80mg/mlサケ精子DNA)中で42℃で1時間保持した。DIG標識した前述のDNA断片をハイブリダイゼーション液に加え、さらに16時間のインキュベーションを行った。

【0065】

洗浄液(0.2×SSC、0.1%SDS)でフィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼで標識されたDIG特異的な抗体による酵素免疫測定法(ベーリンガー・マンハイム株式会社)により5-ブromo4-クロロ3-インドリルリン

酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって検出した。検出方法は製造者による使用説明書に従った。

【0066】

この結果、数十個の陽性クローンが得られ、うち20クローンをストラタジーン社の推奨する方法で、cDNAをプラスミドpBlue-script SK上に回収した。アガロースゲル電気泳動でcDNAの挿入を調べたところ、全てのクローンにおいて各種サイズのcDNAの挿入が認められ、そのうち最長のものは1.7kbであった。それらのうちから適当に9クローンを選び制限酵素による解析を行ったところ、サイズは異なるが全てのクローンで同様の制限酵素パターンを示した。

【0067】

(5) 塩基配列の決定

得られたクローンからプラスミドを抽出し、ABI373A・DNA シーケンサー（パーキンエルマー社）を用い、同社の推奨する蛍光試薬によるダイデオキシ シーケンス法で、前述の9クローンのうち全長を含むと考えられる6つのクローン（pGAT2、pGAT3、pGAT4、pGAT7、pGAT8及びpGAT11）についてcDNAの5'側の塩基配列を決定した。

【0068】

その結果、これらのクローンは互いに同じ塩基配列を持っており、cDNAの長さが異なるものと考えられた。これらのクローンのうちpGAT4の全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Kilo-Sequence用 Deletion Kit（宝酒造（株））を用いて、一連の欠失クローンを得た後、各々のクローン用いて上述の方法により行った。

【0069】

(6) 塩基配列とアミノ酸配列の比較

pGAT4に挿入されたcDNAは1703塩基でありその中に1410塩基（終止コドンを含む）からなるオープンリーディングフレーム（ORF）が見い出された。この配列を配列表・配列番号1に示す。実施例2で明らかになったアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列の全てがORF中のアミノ配列として存在する

ことから、クローニングされた cDNA は、リンドウ由来のアシル基転移酵素遺伝子であると結論した。開始コドンについては、アミノ末端の解析からグルタミン酸がアミノ末端の残基であると推測されたので、cDNA の塩基配列の上で、5' 側から最初の ATG が開始コドンであると推察した。

【0070】

一方、pGAT8 に係る cDNA は、5' 側が pGAT4 よりも 7 塩基短いため、完全長の cDNA ではないと考えられた。

【0071】

#### 実施例 4 大腸菌における遺伝子の発現

##### (1) 発現プラスミドの構築

大腸菌でのアシル基転移酵素遺伝子の発現には、大腸菌の発現ベクターである pTrc99A (ファルマシア社) を用いた。この pTrc99A はイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導可能な大腸菌の trc プロモーターを含み、その下流に目的遺伝子を挿入することにより、大腸菌での遺伝子発現が可能になる。

【0072】

また、制限酵素 NcoI 部位が開始コドンである ATG 配列を利用して導入されており、NcoI 部位で組換えることにより、目的遺伝子の開始コドンからの直接発現が可能である。

【0073】

pGAT4 を当該ベクター内に存在する制限酵素部位 EcoRI と KpnI で消化して得られる約 1.8 kb (7) DNA 断片 (配列表・配列番号 1 記載の塩基配列を全て含む) を前述の pTrc99A (7) EcoRI、KpnI 部位に組換えることにより、pGAT101 を構築した。

【0074】

アシル基転移酵素の開始コドン近傍に NcoI 部位の導入を行うために、開始コドン近傍、及びアシル基転移酵素遺伝子内部 (開始コドンから 300 塩基目付近) に対応する以下の 2 種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0075】

オリゴヌクレオチド (GAT-NcoI) ;

【化12】

5'-TTCACCATGGAGCAAATCCAAATGGT-3'

【0076】

オリゴヌクレオチド (GAT-ScaI) ;

【化13】

5'-CGAGTCGCCCTCATCAC-3'

【0077】

10 ngのpGAT4を鋳型とし、上記のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行った。反応はポリメラーゼチェーン反応キットGene Amp (宝酒造 (株)) を用いて、95℃1分、56℃1分、72℃2分を1サイクルとし、15サイクル行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約300 bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、制限酵素NcoIとAatIで切断後、pGAT101をNcoIとAatIで切断して得られる約6 kbの断片と連結することにより、pGAT102を構築した。PCR法により増幅した部分の塩基配列はpGAT102構築後にpGAT4と同じであることを確認した。

【0078】

(2) アシル基転移酵素遺伝子の大腸菌での発現

pGAT102で大腸菌MM294 (supE44 hsdR endA1 pro thi) (Meselson and Yuan, Nature, 217, 1110-, 1968) を形質転換した。なお、ここで形質転換される宿主は、形質転換用の宿主として利用可能な大腸菌であれば特に特定されるものではなく、遺伝子組換えに一般に用いられ、当業者が容易に入手できるその他の株 (例えば、JM109やDH5等) を利用することができる。また、大腸菌の形質転換方法はHanahanの方法に従った (J. Mol. Biol., 166, 557-, 1983)。形質転換された大腸菌をアンピシリン (50 µg/ml) を含む2 ml (7) LB培地 (トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10 gを1リッターの蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウム

でpHを7.2に調整する)に植菌し、37℃で一晩培養した。

【0079】

この培養液1mlを10ml(7)M9培地(リン酸一水素ナトリウム 0.6%、リン酸二水素カリウム 0.3%、塩化ナトリウム 0.5%、塩化アンモニウム 0.1%、グルコース 0.5%、硫酸マグネシウム 1mM、ビタミンB14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、pH7.2)にカザミノ酸0.5%とアンピシリン50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培地に接種し、37℃で3時間培養後、0.5M(7)IPTGを40  $\mu\text{l}$ 添加(終濃度2mM)し、更に5時間培養を続けた。集菌後、30mM塩化ナトリウムを含む30mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)で洗浄し、洗浄菌体を同じバッファー1mlに懸濁した。1mgリゾチーム、0.25M EDTAを25ml加えて30分間0℃に放置した後、凍結・融解を3回繰り返して菌体を破壊した。

【0080】

これを15000rpm、30分間遠心をして得た上清を粗酵素液とし、実施例1(3)で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pGAT102を導入した大腸菌ではアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。

【0081】

その結果、pGAT102を導入した大腸菌では24nmolのデルフィニジン3,5-ジグルコシドと21.5nmolのカフェオイル-CoAから18.3nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。

この結果と、リンドウのアントシアニンにおいては5位と3'位のグルコースにアシル基が結合しているという既知の事実と併せて考えると、pGAT4がコードするアシル基転移酵素はアントシアニジン3,5-ジグルコシドの5位のグルコースにアシル基を転移する反応を触媒することが判った。

また、大腸菌で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3,5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

【0082】

実施例5     酵母における遺伝子の発現

(1) 酵母の発現ベクター

酵母の発現ベクター pYGA2269 (Ashikari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989、特開昭62-158481参照) を EcoRI と BglII で消化して得られる約 8 kb (7) DNA断片と、M13mp18 (例えば、宝酒造(株)) を EcoRI と BglII で消化して得られる約 0.6 kb の DNA断片を連結して得られるプラスミドを pYGA22m とした。pYGA22m を SalI で消化したのちに得られる約 8 kb (7) DNA断片を自己連結 (セルフライゲーション) してプラスミド pYE22m を構築した。

【0083】

(2) アシル基転移酵素遺伝子の酵母での発現

pGAT4 又は pGAT8 を当該各ベクター内に存在する制限酵素部位 EcoRI と KpnI で消化して得られる約 1.8 kb (7) DNA断片と pYE22m を同じく EcoRI と KpnI で消化して得られる約 8 kb (7) DNA断片を連結して酵母発現プラスミド pYGAT4 と pYGAT8 を各々構築した。pYGAT4 は第1番目のメチオニンからの翻訳を行うが、pYGAT8 では分離した cDNA の 5' 側の一部が欠けているため、アシル基転移酵素の翻訳開始メチオニン (配列表・配列番号1におけるアミノ酸配列番号; -1) ではなく、次のメチオニン (配列表・配列番号1におけるアミノ酸配列番号; 5) からの翻訳が行われる。

【0084】

これらの酵母発現プラスミドでは、アシル基転移酵素をコードしている cDNA は酵母の構成的なプロモーターのひとつであるグリセロアルデヒド-3リン酸脱水素酵素のプロモーターの下流に連結されており、同プロモーターにより転写が制御されている。

【0085】



伊藤らの方法 (Ito et al. J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) を用い pYGAT4 及び pYGAT8 で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G1315 (Ashikari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989) を形質転換した。形質転換された酵母はトリプトファンの合成能の回復により選択した。

なお、ここで形質転換に用いる酵母の宿主は特に限定されるものではなく、TRPI 遺伝子が不完全なためにトリプトファンの要求性を示す株であれば何れのものでも用いることができる (例えば、イースト・ジェネティク・ストック・センターより購入可能 (Yeast Genetic Stock Center; Berkeley, CA, USA; カタログ第7版 (1991年) 第36頁) )。

#### 【0086】

得られた形質転換株を 10 ml (7) 1% カザミノ酸 (Difco 社) を含むバークホルダー培地 (Burkholder, Amer. J. Bot. 30, 206-210) にて、30℃ で 40 時間振盪培養した。併せて、対照実験のために、トリプトファンの合成能を自然に回復した酵母も同様に培養した。

#### 【0087】

これらを集菌後、同量の菌体破碎用バッファー (30 mM トリス塩酸 pH 7.5, 30 mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、さらに 1 ml の同じバッファーにサスペンドし、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移した。遠心分離後、上清を除き 0.4 ml の同じバッファーで沈殿菌体を再度サスペンドし、400 mg のグラスビーズ (Glass Beads 425-600 microns Acid-Wash, シグマ社) を加えて激しく振盪することにより、酵母菌体を破碎した。

#### 【0088】

遠心分離後の上清を粗酵素液とし実施例 1 (3) で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pYGAT4 及び pYGAT8 を導入した酵母は何れもアシル基転移反応が確認されたので、HP

LCによる分析を行った。なお、対照に用いた酵母ではアシル基転移活性は認められなかった。

【0089】

その結果、pYGAT4及びpYGAT8を導入した酵母では24nmolのデルフィニジン3, 5-ジグルコシドと21.5nmolのカフェオイル-CoAから各々16.6nmolと20.9nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。pYGAT4とpYGAT8から生産される蛋白質はそのアミノ末端が異なるが、ともにアシル基転移酵素活性を保持していた。

また酵母で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3, 5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

【0090】

実施例6 リンドウ由来のアシル基転移酵素のcDNAクローニング (2)

実施例3(6)に記載のpGAT4、即ち配列表・配列番号1記載のDNAを有するpGAT4を、制限酵素EcoRIとNdeIで消化して得られるDNA断片のうち、アシル基転移酵素の翻訳領域を含むDNA断片2つをまとめて回収し、前述の方法でDIG標識した。これをプローブとして実施例3(4)に記載したリンドウの花弁のcDNAライブラリーのファージを吸着させたフィルター(Hybond N+, アマーシャム社)を、製造者(アマーシャム社)が推奨する方法でフィルターに結合した色素及びDIG標識を除去して再生した後、低濃度ホルムアミドハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC、30%ホルムアミド、50mM Tris-HCl、pH7.5、1%SDS)中で42度で16時間ハイブリダイズした。

【0091】

洗浄液(5×SSC、0.1%SDS)中で50度で洗浄し、実施例3(4)に記載したように発色させた。数十のクローンが発色したが、発色したクローンのうちで、実施例3(4)では発色しなかったクローンを12個得た。これらのクローンのcDNAの塩基配列を先に述べたような方法で、5'側から決定した

ところ、11クローンはpGAT4の塩基配列と一致したが、1クローンは一致しなかった。これをpGAT106とした。

#### 【0092】

pGAT106の全塩基配列を先に述べたようにして決定した。pGAT106に挿入されたcDNAは1622塩基でありその中に1440塩基（終止コドンを含む）からなるORFが見い出された。これを配列表・配列番号2に示す。配列番号2が含むORFについて、pGAT4がコードするアミノ酸配列と全領域にわたって、相同性を調べた。そのホモロジーは、38%であった。

#### 【0093】

pGAT106のコードするアミノ酸配列は、アシル基転移酵素であるpGAT4のコードしている酵素と相同であるため、同様な酵素活性、つまりアントシアニンにアシル基転移を触媒する活性を持っていると推測される。リンドウのアントシアニンは、5位と3'位のグルコースにアシル基が結合しているので、pGAT106がアントシアニンの3'位のグルコースにアシル基を転移する酵素反応を触媒することを示唆する。また、この結果はアシル基転移酵素は、アシル基を転移するアントシアニンの糖の位置は異なっているとしても、アミノ酸配列及びそれをコードしている塩基配列は相同であることを示している。

先に述べたようにアシル基を有するアントシアニンは多数存在し、これら化合物のアシル基の数や位置は多様性に富み、アシル基の転移反応を触媒する酵素も多数あることが推測されるが、それらの酵素のアミノ酸配列は、ここで得られたpGAT4及びpGAT106のアミノ酸配列と相同性がみられることは容易に類推でき、これに基づき、他のアシル基転移酵素遺伝子を得ることができる。

#### 【0094】

##### 実施例7 ペチュニアのアントシアニン

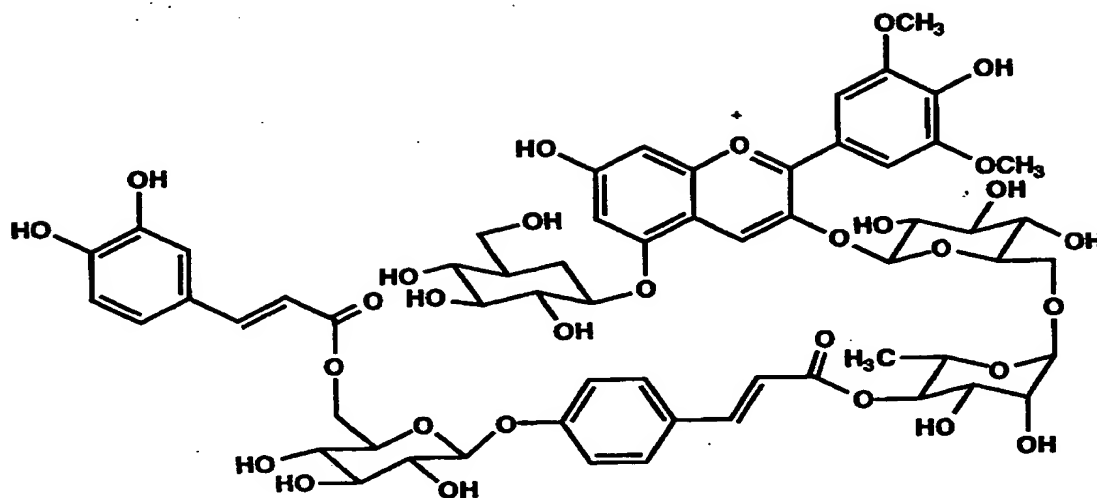
ペチュニア (*Petunia hybrida*) 品種サフィニアパープル (サントリー (株)) の花色が通常の赤紫から紫に変異した変異株 (VM) のアントシアニンをその花卉を液体窒素中で粉碎し、50%アセトニトリル、0.1% TFA水溶液で抽出した。濾過後、濾液をODS、ODPの逆相カラムクロマトグラフィーで分離、精製した。そのうちの一つの化合物の構造をFABMS、<sup>1</sup>H

NMR、 $^{13}\text{C}$ NMRを用いて、詳細に解析したところ、新規なアントシアニンを見いだした。

その構造を以下に示す。

【0095】

【化14】



【0096】

即ち、この構造は3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-カフェオイル-β-D-グルコピラノシル)-クマロイル)-α-L-ラムノシル)-β-D-グルコピラノシル)-5-O-β-D-グルコピラノシル-マルビジンであり、アシル基が2つ結合したアントシアニンであった。

【0097】

また、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-クマロイル-β-D-グルコピラノシル)-クマロイル)-α-L-ラムノシル)-β-D-グルコピラノシル)-5-O-β-D-グルコピラノシル-マルビジン、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-カフェオイル-β-D-グルコピラノシル)-カフェオイル)-α-L-ラムノシル)-β-D-グルコピラノシル)-5-O-β-D-グルコピラノシル-マルビジン、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-クマロイル-β-D-グルコピラノシル)-カフェオイル)-α-L-ラムノシル)-β-D-グルコピラノシル)-5-O-β-D-グルコピラノシル-マルビジンも検出された。このアントシアニンは、VMの花

弁のみならず、フルコンブルー（サカタのタネ（株））、Old Glory Blue (Ball Seeds) などの濃い紫色の花弁にも存在していることがわかった。即ち、アシル基を2つ持つアントシアニンがペチュニアの濃い紫色に寄与していると思われる。

【0098】

従って、ペチュニア由来のアントシアニンに関するアシル基転移酵素には、アントシアニンの3位のルチノシドにクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素と、モノアシルマルビジンにグルコースを介してクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素の2種類があることを示唆する。

【0099】

#### 実施例8 ペチュニア由来のアシル基転移酵素のcDNAクローニング

実施例3(6)に記載のpGAT4、即ち配列表・配列番号1記載のDNAを有するpGAT4のcDNA部分を、前述の方法でDIG標識し、ペチュニア (*Petunia hybrida*) 品種オールドグローリーブルーの花弁のcDNAライブラリー (Nature, 366, 276-279, 1993) をブランクハイブリダイゼーションの手法により、スクリーニングした。ハイブリダイゼーションと洗浄は、実施例6と同様の条件で行った。

【0100】

約20万クローンをスクリーニングし、弱くハイブリダイズするクローンを1つ得た。このクローンをpPAT5とした。塩基配列を決定したところ、pPAT5には複数のDNAが挿入されていた。すなわち、プラスミドのリバースプライマー側に、pGAT4およびpGAT106のコードする蛋白質のC末端の配列に似た配列が存在した。そこで、この配列をもとに、

【0101】

ヌクレオチド配列；

【化15】

5'-AACAGCTATGACCATG-3'

を合成し、このオリゴヌクレオチドをRPプライマーとした。

【0102】

pPAT5のcDNAの完全長を取得するために、RPプライマー、オリゴ2プライマー各100ng、XhoIで消化したpPAT5・10ngを最終体積50 $\mu$ lで、PCR反応を行った。反応は、95℃1分、55℃1分、72℃1分を1サイクルとし、20サイクル行った。得られた約600bp(7)DNA断片をアガロース電気泳動後、ジーンクリーンで精製した。この断片をSmaIで酵素消化した後、約400bpのDNA断片を同様に精製した。このDNA断片を前述のDIGで標識した。

#### 【0103】

この標識したDNA断片を用いて、前述のペチュニアの花弁cDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーションの手法を用いて、スクリーニングした。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、0.2XSSC、65℃、1時間とした。得られたクローンから回収したプラスミドの塩基配列を決定したところ、pPAT48が、pPAT5と同じ配列を含むことがわかった。これを配列表・配列番号3に示す。この配列は、pGAT4とpGAT106に対して、アミノ酸配列レベルで、それぞれ20%、16%のホモロジーがあった。

#### 【0104】

##### 実施例9 シソ由来の粗酵素液の抽出

シソ(*Perilla ocimoides*)・品種赤チリメンの植物体から、赤い若い葉を採集し、実施例1(2)に記載の方法に従って、粗酵素液の抽出を行った。最終濃度50mMリン酸カリウム(pH8.5)、0.48mMデルフィニジン3,5-ジグルコシド、0.43mMカフェオイル-CoAと20 $\mu$ lの酵素液を含む50 $\mu$ lの混合物を30℃で10分間反応させた。反応液に13.8%の酢酸を含む50 $\mu$ lのアセトニトリルを加えて反応を停止した。15000回転で5分間遠心した後、上清のうちの10 $\mu$ lを以下の条件でHPLCにて解析した。

#### 【0105】

カラムはYMC-Pack ODS-A(6.0X15cm)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸、21.6%アセトニトリルの溶媒で、流速1ml/分の条件でサンプルを分離した。検出は、520nmで行った。この条件で未反応のデ

ルフィニジン3, 5-ジグルコシドは、3分で、デルフィニジン3, 5-ジグルコシドの3位にカフェ酸が転移したものは、4.7分に溶出され、この化合物の吸収極大値は、531nmであった。

【0106】

基質として、デルフィニジン3-グルコシドを用いた場合も、カフェ酸による修飾が見られた。また、アシル基の供与体として、クマロイル-COAを用いても、クマール基の転移が見られた。シソは天然にはアントシアニンとしてデルフィニジングルコシドは含まないが、シソのアシル基転移酵素はデルフィニジン3-グルコシドとデルフィニジン3, 5-ジグルコシドをアシル基受容体として、クマロイル-COAをアシル基供与体として利用できることがわかった。

【0107】

#### 実施例10 シソ由来のアシル基転移酵素の精製

シソアシル基転移酵素の精製は、実施例2(1)に準じて行った。3kgのシソの葉を、液体窒素で凍結させ、凍結したままホモジナイザーで、粉碎した。粉末状になったものに101の抽出緩衝液(100mMリン酸ナトリウム、pH6.8、10mMアスコルビン酸ナトリウム、5mMジチオスレオトル、10μM p-APMSF、5%(w/v)ポリクラールSB-100)中で、再び、ホモジナイザーで磨砕した。これを4層に重ねたガーゼで濾過後、遠心分離(8000回転、4度、30分)を行った。上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて、溶解後、同じ条件で遠心分離を行う。上清に70%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、溶解後、同じ条件で遠心分離を行う。沈殿を最小量の脱塩緩衝液(ピストリス塩酸、pH6.3、1mMジチオスレイトール、10μM p-APMSF、10%グリセロール)に溶解した後、同じ緩衝液で平衡化したセファデックスG-25メデイウム(ファルマシア社、9.5X45cm)で脱塩した。

【0108】

脱塩したサンプルをQ-セファローズファーストフロー26/10を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。脱塩緩衝液をもとにした塩化ナトリウムの0から0.5Mの直線濃度勾配を8ml/分の流速で1時間かけて行った。活

性画分は、食塩濃度0.15から0.3M付近で溶出された。この活性画分を、脱塩緩衝液で平衡化したHiTrapBlue (5ml)を4本直列に接続したカラムに吸着させた。同じ緩衝液でカラムを良く洗浄した後、脱塩緩衝液をもとにした0から1Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配(2時間、流速5ml/分)で溶出した。活性画分は塩化ナトリウム濃度0.8から0.9Mで溶出した。この画分を次にヒドロキシアパタイトカラム(セラミックタイプ11 40mm; バイオラド社)でクロマトグラフィーを行った。緩衝液A(50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、1mMジチオスレイトール、10 $\mu$ M p-APMSF)10%グリセロール)で、サンプルをかけたカラムをよく洗浄し、緩衝液Aから緩衝液B(400mMリン酸ナトリウム、pH6.8、1mMジチオスレイトール、10 $\mu$ M p-APMSF、10%グリセロール)への直線濃度勾配(1時間、流速2.5ml/分)で酵素を溶出したところ、約0.2Mリン酸ナトリウムで溶出した。

この活性画分を用いて酵素の生化学的性質を調べた。

【0109】

粗酵素標品を用いた場合と同様に、アシル基の受容体としては、シアニジン3-グルコシド、シアニジン3, 5-ジグルコシド、デルフィニジン3-グルコシド、デルフィニジン3, 5-ジグルコシドのいずれを用いることができた。アシル基の供与体としては、クマロイル-CoAでも、カフェオイル-CoAでも用いることができた。また、SDSポリアクリルアミド電気泳動から、分子量は約50000であった。等電点は、Mono-Pカラム(ファルマシア社)を用いて、5.3と決定した。

【0110】

#### 実施例11 シソ由来のアシル基転移酵素のcDNAクローニング

実施例3、実施例6及び実施例8でクローニングしたpGAT4、pGAT106、pPAT48の構造を比較すると、

【0111】

アミノ酸配列；



【化16】

Asp-Phe-Gly-Trp-Gly-Lys

が保存されていることがわかった。従って、この構造は、アシル基転移酵素において保存されていることが予想される。そこで、この配列をもとに、

【0112】

ヌクレオチド配列；

【化17】

5'-GA(TC)TT(TC)GGITGGGGIAA-3'

を合成し、このオリゴヌクレオチドをATCプライマーとした。

【0113】

シソの若い葉からRNAを実施例3に記載の方法で抽出し、同じく、ZAP-cDNA合成キット（ストラタジーン社製）を用い、cDNAライブラリーを作製した。この際にできた2本鎖のcDNA約50ngを鋳型にして、ATCプライマーとオリゴ2プライマーを各100ng用い、最終体積50μlにて、PCRキット（宝酒造（株）製）を用いて、PCR反応を行った。反応は、95℃1分、50℃1分、72℃1分を1サイクルとし、25サイクル行った。得られた約400bp（7）DNA断片を回収し、TAクローニングキット（Invitrogen社）を用いて、ベクターにクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定したところ、pSAT104としたクローンがpGAT4に対して高いホモロジーを示した。

【0114】

10ngのpSAT104を鋳型にして、ATCプライマーとオリゴ2プライマーを各100ng用いて、最終体積50μlにて、PCRキット（宝酒造社（株）製）を用いて、PCR反応を行った。反応は、95℃1分、50℃1分、72℃1分を1サイクルとし、15サイクル行った。この反応物の1μlを用い、ATCプライマーとオリゴ2プライマーを各100ng用いて、最終体積50μlにて、同様にPCRキットを用いて、PCR反応を行った。

ただし、この際デオキシヌクレオチド溶液として、DIG標識ヌクレオチド溶液（ベーリンガー社製）を4μl用いた。反応終了後、5μlの3M酢酸ナトリ

ウムと100  $\mu$  lのエタノールを加え、エタノール沈殿を行い、以後の実験に用いた。

【0115】

このpSAT104由来の標識DNAを用いて、シソの葉のcDNAライブラリーをブラクハイブリダイゼーションの手法でスクリーニングした。洗浄は、1XSSC、65℃で1時間行った。ハイブリダイズしたクローンの塩基配列を決定したところ、pSAT206、pSAT207、pSAT208、pSAT209、pSAT210などのクローンがpSAT104の塩基配列を含んでいることがわかった。これらのクローンの5'側の塩基配列をpGAT4と比較したところ、どのクローンもpGAT4よりアミノ末端が短く開始コドンも見られなかった。また、pSAT206とpSAT208、pSAT209とpSAT210は、5'側の塩基配列は同一であった。pSAT207は、pSAT206より6残基、pSAT209はpSAT206より5残基短かった。

【0116】

ベクターpBluescript SK-上で、これらのcDNAは、ベクターのLacZ遺伝子と融合できる形となっている。上のクローンの内、pSAT206、pSAT208、pSAT207は、LacZのコードしている大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼと融合蛋白として発現できる形になっているが、pSAT209とpSAT210は、フレームがずれているので融合蛋白質とはならない。pSAT206、pSAT207、pSAT209、pSAT210を大腸菌で発現させ、デルフィニジン3, 5-ジグルコシドとカフェオイル-CoAを用いて、3位のグルコースへのアシル基転移酵素活性を測定した。発現の誘導などの方法は、実施例4に記載の方法に従った。

【0117】

pSAT209、pSAT210を含む大腸菌は、アシル基転移酵素活性を全く示さなかったが、pSAT206を含む大腸菌は、デルフィニジン3, 5-ジグルコシドの48%をアシル化する酵素活性を示し、pSAT207を含む大腸菌は同じく24%をアシル化する酵素活性を示した。このことから、得られたpSAT206、pSAT207などは、シソのアントシアニンの3位のグルコー

スにアシル基を転移する酵素活性を持つ遺伝子をクローニングできたことが証明できた。

【0118】

これらのクローンの内、pSAT208のcDNA由来の塩基配列を決定した。

これを配列表・配列番号4に示す。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、pGAT4、pGAT106、pPAT48に対して、37%、29%、15%のホモロジーを示した。先に述べたようにこの配列は、完全長のcDNAではないが、LacZとの融合遺伝子などとして、適当な開始コドンを与えることで、活性のある酵素を発現できる。

また、このように本発明で明らかになったアシル基転移酵素のアミノ酸配列を比較することにより、保存されている領域が明らかになった。この領域のアミノ酸配列をもとにすれば、アントシアニンの他の位置の糖を修飾するアシル基転移酵素をクローニングすることができる。

【0119】

#### 実施例12 サイネリア由来のアシル基転移酵素のcDNAクローニング

サイネリア (Senecio cruentus) 品種ジュピターブルー (サカタノタネ) の花卉から実施例3に記載の方法でRNAを抽出し、さらにPolyA+RNAを精製した。ZAP-cDNA合成キット (ストラタジーン社製) を用いて、cDNAライブラリーを作製した。

【0120】

この際にできた2本鎖のcDNA約50ngを鋳型にして、ATCプライマーとオリゴ2プライマーを各100ng用い、最終体積50 $\mu$ lにて、宝のPCRキットを用いて、PCR反応を行った。反応は、95℃1分、50℃1分、72℃1分を1サイクルとし、25サイクル行った。得られた約400bp (7) DNA断片を回収し、TAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて、ベクターにクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定したところ、pJAT4としたクローンがpGAT4に対して高いホモロジーを示した。

【0121】

次にサイネリアの花弁 cDNA ライブラリーを pJAT4 でスクリーニングした。いくつかのクローンが得られたが、それらの cDNA の 5' 端側の塩基配列から類推したアミノ酸配列は、pGAT4 のコードしている蛋白質の配列と比較してみると、サイネリアのクローンの cDNA はいずれも完全長ではなかった。

そのうち、pCAT8 としたクローンの cDNA の前塩基配列を決定した。これを配列表・配列番号 5 に示す。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、pGAT4、pGAT106、pPAT48、pSAT208 に対してそれぞれ 28%、35%、16%、37% のホモロジーを示した。

【0122】

【発明の効果】

以上のように、本発明においてはリンドウ由来の芳香族アシル基転移酵素の精製、当該酵素の cDNA のクローニング及び当該 cDNA の塩基配列の決定を行った。また、大腸菌と酵母での活性発現を行うことにより、分離した cDNA が芳香族アシル基転移酵素をコードするものであることを確認した。

従って、本発明に係る cDNA を適当な植物発現ベクターに接続し、植物に導入することにより、アシル化反応を植物の花色調節に利用することが可能となった。

また、本酵素活性を利用することにより、植物の中であるいは試験管内でアントシアンの構造を改変し、より安定なアントシアンを提供することができる。

【0123】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1703

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (Linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) 組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT4

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TCATT ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAG GTT CTT GAA AAA TGC	44
Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys	
-1 1 5 10	
CAA GTT ACA CCA CCA TCT GAC ACA ACA GAT GTC GAG TTA TCG CTA	89
Gln Val Thr Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu	
15 20 25	
CCG GTA ACA TTC TTC GAT ATC CCC TGG TTG CAC TTG AAT AAG ATG	134
Pro Val Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Asn Lys Met	
30 35 40	

CAG TCC CTT CTG TTT TAC GAC TTT CCG TAC CCA AGA ACA CAT TTC	179
Gln Ser Leu Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Arg Thr His Phe	
45 50 55	
TTG GAC ACT GTT ATC CCT AAT CTT AAG GCC TCT TTG TCT CTC ACT	224
Leu Asp Thr Val Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr	
60 65 70	
CTA AAA CAC TAC GTT CCG CTT AGC GGA AAT TTG TTG ATG CCG ATC	269
Leu Lys His Tyr Val Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile	
75 80 85	
AAA TCG GGC GAA ATG CCG AAG TTT CAG TAC TCC CGT GAT GAG GGC	314
Lys Ser Gly Glu Met Pro Lys Phe Gln Tyr Ser Arg Asp Glu Gly	
90 95 100	
GAC TCG ATA ACT TTG ATC GTT GCG GAG TCT GAC CAG GAT TTT GAC	359
Asp Ser Ile Thr Leu Ile Val Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp	
105 110 115	
TAC CTT AAA GGT CAT CAA CTG GTA GAT TCC AAT GAT TTG CAT GGC	404
Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val Asp Ser Asn Asp Leu His Gly	
120 125 130	
CTT TTT TAT GTT ATG CCA CGG GTT ATA AGG ACC ATG CAA GAC TAT	449
Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile Arg Thr Met Gln Asp Tyr	
135 140 145	
AAA GTG ATC CCG CTC GTA GCC GTG CAA GTA ACC GTT TTT CCT AAC	494
Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val Thr Val Phe Pro Asn	
150 155 160	
CGT GGC ATA GCC GTG GCT CTG ACG GCA CAT CAT TCA ATT GCA GAT	539
Arg Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His Ser Ile Ala Asp	
165 170 175	

GCT AAA AGT TTT GTA ATG TTC ATC AAT GCT TGG GCC TAT ATT AAC	584
Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Ile Asn Ala Trp Ala Tyr Ile Asn	
180 185 190	
AAA TTT GGG AAA GAC GCG GAC TTG TTG TCC GCG AAT CTT CTT CCA	629
Lys Phe Gly Lys Asp Ala Asp Leu Leu Ser Ala Asn Leu Leu Pro	
195 200 205	
TCT TTC GAT AGA TCG ATA ATC AAA GAT CTG TAT GGC CTA GAG GAA	674
Ser Phe Asp Arg Ser Ile Ile Lys Asp Leu Tyr Gly Leu Glu Glu	
210 215 220	
ACA TTT TGG AAC GAA ATG CAA GAT GTT CTT GAA ATG TTC TCT AGA	719
Thr Phe Trp Asn Glu Met Gln Asp Val Leu Glu Met Phe Ser Arg	
225 230 235	
TTT GGA AGC AAA CCC CCT CGA TTC AAC AAG GTA CGA GCT ACA TAT	764
Phe Gly Ser Lys Pro Pro Arg Phe Asn Lys Val Arg Ala Thr Tyr	
240 245 250	
GTC CTC TCC CTT GCT GAA ATC CAG AAG CTA AAG AAC AAA GTA CTG	809
Val Leu Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Lys Asn Lys Val Leu	
255 260 265	
AAT CTC AGA GGA TCC GAA CCG ACA ATA CGT GTA ACG ACG TTC ACA	854
Asn Leu Arg Gly Ser Glu Pro Thr Ile Arg Val Thr Thr Phe Thr	
270 275 280	
ATG ACG TGT GGA TAC GTA TGG ACA TGC ATG GTC AAA TCA AAA GAT	899
Met Thr Cys Gly Tyr Val Trp Thr Cys Met Val Lys Ser Lys Asp	
285 290 295	
GAC GTC GTA TCA GAG GAA TCA TCG AAC GAC GAA AAT GAG CTC GAG	944
Asp Val Val Ser Glu Glu Ser Ser Asn Asp Glu Asn Glu Leu Glu	
300 305 310	

TAC TTC AGT TTT ACA GCG GAT TGC CGA GGA CTT CTG ACG CCC CCG	989
Tyr Phe Ser Phe Thr Ala Asp Cys Arg Gly Leu Leu Thr Pro Pro	
315 320 325	
TGT CCG CCT AAC TAC TTT GGC AAC TGT CTT GCG TCA TGC GTT GCA	1034
Cys Pro Pro Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ala Ser Cys Val Ala	
330 335 340	
AAA GCA ACA CAT AAA GAG TTA GTT GGG GAT AAA GGG CTT CTT GTT	1079
Lys Ala Thr His Lys Glu Leu Val Gly Asp Lys Gly Leu Leu Val	
345 350 355	
GCA GTT GCA GCT ATT GGA GAA GCC ATT GAA AAG AGG TTG CAC AAC	1124
Ala Val Ala Ala Ile Gly Glu Ala Ile Glu Lys Arg Leu His Asn	
360 365 370	
GAA AAA GGC GTT CTT GCA GAT GCA AAA ACT TGG TTA TCG GAA TCT	1169
Glu Lys Gly Val Leu Ala Asp Ala Lys Thr Trp Leu Ser Glu Ser	
375 380 385	
AAT GGA ATC CCT TCA AAA AGA TTT CTC GGG ATT ACC GGA TCG CCT	1214
Asn Gly Ile Pro Ser Lys Arg Phe Leu Gly Ile Thr Gly Ser Pro	
390 395 400	
AAG TTC GAT TCG TAT GGT GTA GAT TTT GGA TGG GGA AAG CCT GCA	1259
Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Ala	
405 410 415	
AAA TTT GAC ATT ACC TCT GTT GAT TAT GCA GAA TTG ATT TAT GTG	1304
Lys Phe Asp Ile Thr Ser Val Asp Tyr Ala Glu Leu Ile Tyr Val	
420 425 430	
ATT CAG TCC AGG GAT TTT GAA AAA GGT GTG GAG ATT GGA GTA TCA	1349
Ile Gln Ser Arg Asp Phe Glu Lys Gly Val Glu Ile Gly Val Ser	
435 440 445	



TTG CCT AAG ATT CAT ATG GAT GCA TTT GCA AAA ATC TTT GAA GAA 1394  
 Leu Pro Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu Glu  
 450 455 460  
 GGC TTT TGC TCT TTG TCA TAGTCTCTTT AATAGAACCA TATTTGCTGC 1442  
 Gly Phe Cys Ser Leu Ser  
 465 468  
 AATAAAGTAC CAAGTCCTTT AGTAACACTA CACCAAACCC TACTTTCGAG GCGGGAACAC 1502  
 CACAACGAGG TTCAATCACT AGAAGGTTGT ACTTCATAAA TTCCAGAGGT CGAATATACA 1562  
 CCGTTGTCCT CTGAAAAGTT GAACCTCACA CCTGACATGG TGTTACGATA GGTATTGTAT 1622  
 AATGCCATTA TATACTTCCA TAAAGTATCC TATGCAATAG AGAACATGTT ATGTGTTAAA 1682  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1703

【0124】

配列番号 (SEQ ID NO) : 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1622

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (*Gentiana triflora*  
 var. *japonica*) 組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁  
 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT106

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GAACCATTGA ATCCAATTAA TCTGATTTAT TAAG ATG GCA GGA AAT TCC GAG	52
Met Ala Gly Asn Ser Glu	
1 5	
GAT ATC AAA GTT CTT GAG AAA TGC CGT GTT GCG CCA CCA CCG GAC	97
Asp Ile Lys Val Leu Glu Lys Cys Arg Val Ala Pro Pro Pro Asp	
10 15 20	
GCC GTC GCC GAG TTT ACA GTC CCA CTG TCG TTT TTC GAC ATG CGA	142
Ala Val Ala Glu Phe Thr Val Pro Leu Ser Phe Phe Asp Met Arg	
25 30 35	
TGG TTG ATC TCT GAT GCA GAA CAC CAT CTG CAT TTC TAC AGA TTC	187
Trp Leu Ile Ser Asp Ala Glu His His Leu His Phe Tyr Arg Phe	
40 45 50	
CGC CAT CCT TGT CCC AAC TCT AAA TTT ATC ATT TCA TCC ATT AAA	232
Arg His Pro Cys Pro Asn Ser Lys Phe Ile Ile Ser Ser Ile Lys	
55 60 65	
TCG TCC CTT TCC CTT GTT CTC AAA CAC TTT CTT CCG TTA GCC GGG	277
Ser Ser Leu Ser Leu Val Leu Lys His Phe Leu Pro Leu Ala Gly	
70 75 80	
AAT TTG ATT TGG CCG GTA GAT TCC TCC GAT AGA ATG CCG GAG TTG	322
Asn Leu Ile Trp Pro Val Asp Ser Ser Asp Arg Met Pro Glu Leu	
85 90 95	
CGT TAC AAG AAA GGG GAC TCC GTT TCT TTA ACA ATT GCA GAA TCG	367
Arg Tyr Lys Lys Gly Asp Ser Val Ser Leu Thr Ile Ala Glu Ser	
100 105 110	
AGC ATG GAT TTT GAT TAT CTC GCC GGA GAT CAT CAG AGG GAT TCT	412
Ser Met Asp Phe Asp Tyr Leu Ala Gly Asp His Gln Arg Asp Ser	
115 120 125	

TAT AAA TTC AAC GAT TTG ATT CCG CAG CTG CCA GAA CCG ATT GTA	457
Tyr Lys Phe Asn Asp Leu Ile Pro Gln Leu Pro Glu Pro Ile Val	
130 135 140	
ACC TCC GGC GAC GAA GTA TTA CCA CTT TTT GCT TTA CAG GTG ACG	502
Thr Ser Gly Asp Glu Val Leu Pro Leu Phe Ala Leu Gln Val Thr	
145 150 155	
GTG TTC TCC AAC ACC GGT ATA TGC ATT GGA CGC AAT CTT CAT CAA	547
Val Phe Ser Asn Thr Gly Ile Cys Ile Gly Arg Asn Leu His Gln	
160 165 170	
GTT CTT GGT GAT GCC AGT TCT TTT CTG CAT TTT AAT AAA TTA TGG	592
Val Leu Gly Asp Ala Ser Ser Phe Leu His Phe Asn Lys Leu Trp	
175 180 185	
GTT TTG GTT GAC AAA TCC AAT GGA GAT TCA TTA AAG TTC CTT CCA	637
Val Leu Val Asp Lys Ser Asn Gly Asp Ser Leu Lys Phe Leu Pro	
190 195 200	
CTT TCT TCT CTA CCT ATG TAC GAC AGA TCT GTG GTG CAA GAT CCA	682
Leu Ser Ser Leu Pro Met Tyr Asp Arg Ser Val Val Gln Asp Pro	
205 210 215	
TTT CAT ATT CGT CGA AAA ATC TAC AAT GAA AGA AAA CTG CTC AAA	727
Phe His Ile Arg Arg Lys Leu Tyr Asn Glu Arg Lys Leu Leu Lys	
220 225 230	
TCT CAG GGC ACA CCT ACT GTT CTA AAT CCA GCA ATT TCT AAA GAT	772
Ser Gln Gly Thr Pro Thr Val Leu Asn Pro Ala Ile Ser Lys Asp	
235 240 245	
GAA GTT CGA GCC ACC TTC ATC CTA CAC CCT ATT GAT ATC ATG AAG	817
Glu Val Arg Ala Thr Phe Ile Leu His Pro Ile Asp Ile Met Lys	
250 255 260	

CTC AAG AAA TTC ATT TCG TCA AAA AAT CGC AAC TTA ACC GGT AGT	862
Leu Lys Lys Phe Ile Ser Ser Lys Asn Arg Asn Leu Thr Gly Ser	
265 270 275	
AGT AAT TAT AAT CTG TCA ACT TTC ACG GTG ACA TCT GCA CTG ATC	907
Ser Asn Tyr Asn Leu Ser Thr Phe Thr Val Thr Ser Ala Leu Ile	
280 285 290	
TGG ACA TGC TTG TCG AAA TCA TTA GAC ACC GTC GTA AGA GAG AAG	952
Trp Thr Cys Leu Ser Lys Ser Leu Asp Thr Val Val Arg Glu Lys	
295 300 305	
GTG GAA GAG GAT AAA CAT GCA GCA AAC TTA TGT GCT TTC ATC AAC	997
Val Glu Glu Asp Lys His Ala Ala Asn Leu Cys Ala Phe Ile Asn	
310 315 320	
TGC CGA CAA CGT TTT GCT CCG CCG ATA CCT CAA AAT TAC TTT GGA	1042
Cys Arg Gln Arg Phe Ala Pro Pro Ile Pro Gln Asn Tyr Phe Gly	
325 330 335	
AAT TGC ATA GTG CCT TGT ATG GTG GGA TCG ACT CAT GAG CAA CTT	1087
Asn Cys Ile Val Pro Cys Met Val Gly Ser Thr His Glu Gln Leu	
340 345 350	
GTA GGA AAT GAA GGG TTG TCG GTA GCT GCA ACC GCC ATC GGA GAT	1132
Val Gly Asn Glu Gly Leu Ser Val Ala Ala Thr Ala Ile Gly Asp	
355 360 365	
GCT ATC CAT AAG AGG TTA CAT GAC TAC GAA GGA ATT CTG AGA GGA	1177
Ala Ile His Lys Arg Leu His Asp Tyr Glu Gly Ile Leu Arg Gly	
370 375 380	
GAT TGG ATA TCG CCG CCC CGA TCA ACA TCT GCG GCA CCA AGG TCG	1222
Asp Trp Ile Ser Pro Pro Arg Ser Thr Ser Ala Ala Pro Arg Ser	
385 390 395	

ACG CTC ATT TAT GTC GTT GGA TCC GCA CAA CGC AAT GTG CAT GAT	1267
Thr Leu Ile Tyr Val Val Gly Ser Ala Gln Arg Asn Val His Asp	
400 405 410	
TTT GAT GCA GAT TTT GGT TGG GGA AAG CTT GAA AAG CAT GAA TCT	1312
Phe Asp Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Leu Glu Lys His Glu Ser	
415 420 425	
GTT TCA ACT AAT CCT TCG GCA ACA CTA ATT TTG ATC TCT CGG TCC	1357
Val Ser Thr Asp Pro Ser Ala Thr Leu Ile Leu Ile Ser Arg Ser	
430 435 440	
AGA AGA TTT AAA GGA GCA CTT GAG CTT GGC ATT TCT TTG CCT AAG	1402
Arg Arg Phe Lys Gly Ala Leu Glu Leu Gly Ile Ser Leu Pro Lys	
445 450 455	
AAT AGG ATG GAC GCA TTT GCC ACC ATT TTT ACG AAT TTC ATC AAT	1447
Asn Arg Met Asp Ala Phe Ala Thr Ile Phe Thr Asn Phe Ile Asn	
460 465 470	
AGT CTC CAT GTG AGG AGC CCT TTG TAAGAAAAAA GTGGTATCAA	1491
Ser Leu His Val Arg Ser Pro Leu	
475 479	
TGTATAAAAA AGACAGACAA GTTATGATGC AACAAATGTT TTAGGAGATT ACAAATCCAT	1551
GGGAAGATGT ATCAAACCTCA TCTCTCTATA TATATATATT CAATTGTTTT AAAAAAAAAA	1611
AAAAAAAAAA A	1622

【0125】

配列番号 (SEQ ID NO) : 3

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1605

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : ペチュニア (Petunia hybrida)  
組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pPAT48

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TGTCGACGAA ATCCATTTC TTTCTCTTC TTTCTTGTTT TTCTAATTTC GTCATCATTC	60
TTATCC ATG GCA GGT GAA GTA GCA AAA CAA GAA GTT ACA AAA GTG AAA	108
Met Ala Gly Glu Val Ala Lys Gln Glu Val Thr Lys Val Lys	
1 5 10	
GTC CTG AAA AAA ACA AAC GTG AAA CCA CAT AAA CCA CTA GGA AAA	153
Val Leu Lys Lys Thr Asn Val Lys Pro His Lys Pro Leu Gly Lys	
15 20 25	
AAA GAG TGT CAA TTG GTA ACA TTT GAT CTT CCT TAC CTA GCT TTC	198
Lys Glu Cys Gln Leu Val Thr Phe Asp Leu Pro Tyr Leu Ala Phe	
30 35 40	
TAT TAC AAC CAA AAA TTT CTC ATC TAT AAA GGT GCT GAA AAC TTT	243
Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Gly Ala Glu Asn Phe	
45 50 55	
GAC GAG ACG GTG GAA AAA ATT AAA GAT GGA CTG GCC TTA GTA TTG	288
Asp Glu Thr Val Glu Lys Ile Lys Asp Gly Leu Ala Leu Val Leu	
60 65 70	

GTG GAT TTC TAT CAA CTA GCT GGG AAA CTT GGA AAA GAT GAA GAA		333
Val Asp Phe Tyr Gln Leu Ala Gly Lys Leu Gly Lys Asp Glu Glu		
75	80	85
GGG GTT TTC AGG GTG GAA TAC GAC GAT GAC ATG GAT GGT GTA GAG		378
Gly Val Phe Arg Val Glu Tyr Asp Asp Asp Met Asp Gly Val Glu		
90	95	100
GTG ACA GTG GCT GTT GCA GAA GAG ATA GAA GTT GCA GAT CTT ACT		423
Val Thr Val Ala Val Ala Glu Glu Ile Glu Val Ala Asp Leu Thr		
105	110	115
GAT GAA GAA GGC ACC ACC AAA TTC CAG GAC TTG ATT CCT TGT AAT		468
Asp Glu Glu Gly Thr Thr Lys Phe Gln Asp Leu Ile Pro Cys Asn		
120	125	130
AAA ATC TTG AAT TTG GAA GGG CTT CAT CGC CCT CTT CTA GCT GTG		513
Lys Ile Leu Asn Leu Glu Gly Leu His Arg Pro Leu Leu Ala Val		
135	140	145
CAG CTC ACC AAG CTC AAG GAC GGG CTC ACC ATG GGA TTA GCA TTT		558
Gln Leu Thr Lys Leu Lys Asp Gly Leu Thr Met Gly Leu Ala Phe		
150	155	160
AAC CAT GCT GTG CTG GAT GGT ACT TCG ACG TGG CAC TTT ATG ACC		603
Asn His Ala Val Leu Asp Gly Thr Ser Thr Trp His Phe Met Thr		
165	170	175
TCG TGG TCC GAG CTT TGC TGT GGG TCC ACC TCA ATT TCT GTC CCA		648
Ser Trp Ser Glu Leu Cys Cys Gly Ser Thr Ser Ile Ser Val Pro		
180	185	190
CCA TTC CTT GAA CGA ACC AAG GCT CGT AAC ACT CGA GTC AAG CTC		693
Pro Phe Leu Glu Arg Thr Lys Ala Arg Asn Thr Arg Val Lys Leu		
195	200	205

AAC CTC TCT CAA CCA TCA GAT GCA CCC GAA CAT GCT AAG TCA GCA	738
Asn Leu Ser Gln Pro Ser Asp Ala Pro Glu His Ala Lys Ser Ala	
210 215 220	
ACC AAC GGT GAT GTC CCG GCC AAC GTA GAC CCA CCT CTT CGC GAA	783
Thr Asn Gly Asp Val Pro Ala Asn Val Asp Pro Pro Leu Arg Glu	
225 230 235	
AGA GTA TTC AAG TTC TCC GAG TTA GCA ATT GAC AAA ATC AAG TCA	828
Arg Val Phe Lys Phe Ser Glu Leu Ala Ile Asp Lys Ile Lys Ser	
240 245 250	
ACA GTC AAT GCC AAC TCA GGA GAG ACG CCA TTC TCC ACA TTC CAA	873
Thr Val Asn Ala Asn Ser Gly Glu Thr Pro Phe Ser Thr Phe Gln	
255 260 265	
TCA CTC TCC GCA CAC GTG TGG CTA GCC GTC ACA CGT GCG CGC CAA	918
Ser Leu Ser Ala His Val Trp Leu Ala Val Thr Arg Ala Arg Gln	
270 275 280	
CTC AAG CCC GAG GAC TAC ACT GTG TAC ACT GTG TTT GCT GAT TGC	963
Leu Lys Pro Glu Asp Tyr Thr Val Tyr Thr Val Phe Ala Asp Cys	
285 290 295	
AGG AAA AGG GTT GAT CCT CCA ATG CCA GAA AGT TAC TTC GGC AAC	1008
Arg Lys Arg Val Asp Pro Pro Met Pro Glu Ser Tyr Phe Gly Asn	
300 305 310	
CTA ATT CAG GCA ATT TTC ACA GTG ACC GCG GCA GGT TTG TTA CTA	1053
Leu Ile Gln Ala Ile Phe Thr Val Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu	
315 320 325	
GCA AGC CCG ATC GAG TTC GCT GGT GGG ATG ATA CAA CAA GCG ATC	1098
Ala Ser Pro Ile Glu Phe Ala Gly Gly Met Ile Gln Gln Ala Ile	
330 335 340	



【 0 1 2 6 】

出証特平 08-3032581

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1479

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (n u c l e i c   a c i d)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : シソ (Perilla ocimoides)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 葉 (l e a f)

## 直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pSAT208

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CC GTG ATC GAA ACG TGT AGA GTT GGG CCG CCG CCG GAC TCG GTG 44

Val Ile Glu Thr Cys Arg Val Gly Pro Pro Pro Asp Ser Val

**1                                        5                                        10**

CGC GAG CAA TCG GTG CCG CTC ACA TTC TTC GAC ATG ACG TGG CTG 89

Ala Glu Gln Ser Val Pro Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp Leu

15                      20                      25

CAT TTT CAT CCC ATG CTT CAG CTC CTC TTC TAC GAA TTC CCT TGT 134

His Phe His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr Glu Phe Pro Cys

30 35 40

TCC AAG CAA CAT TTT TCA GAA TCC ATC GTT CCA AAA CTC AAA CAA 179

Ser Lys Gln His Phe Ser Glu Ser Ile Val Pro Lys Leu Lys Gln

**45    50    55**

TCT CTC TCT AAA ACT CTC ATA CAC TTC TTC CCT CTC TCA TGC AAT	224
Ser Leu Ser Lys Thr Leu Ile His Phe Phe Pro Leu Ser Cys Asn	
60 65 70	
TTA ATC TAC CCT TCA TCC CCG GAG AAA ATG CCG GAG TTT CGG TAT	269
Leu Ile Tyr Pro Ser Ser Pro Glu Lys Met Pro Glu Phe Arg Tyr	
75 80 85	
CTA TCC GGG GAC TCG GTT TCT TTC ACC ATC GCA GAA TCT AGC GAC	314
Leu Ser Gly Asp Ser Val Ser Phe Thr Ile Ala Glu Ser Ser Asp	
90 95 100	
GAC TTC GAT GAT CTC GTC GGA AAT CGT CCA GAA TCT CCC GTT AGG	359
Asp Phe Asp Asp Leu Val Gly Asn Arg Pro Glu Ser Pro Val Arg	
105 110 115	
CTC TAC AAC TTT GTC CCT AAA TTG CCG CCC ATT GTC GAA GAA TCC	404
Leu Tyr Asn Phe Val Pro Lys Leu Pro Pro Ile Val Glu Glu Ser	
120 125 130	
GAT AGA AAA CTC TTC CAA GTT TTC GCC GTG CAG GTG ACT CTT TTC	449
Asp Arg Lys Leu Phe Gln Val Phe Ala Val Gln Val Thr Leu Phe	
135 140 145	
CCA GGC CGA GGC GTC GGT ATT GGA ATA GCA ACG CAT CAC ACC GTT	494
Pro Gly Arg Gly Val Gly Ile Gly Ile Ala Thr His His Thr Val	
150 155 160	
AGC GAC GCC CCG TCG TTT CTC GCG TTT ATA ACG GCT TGG TCT TCA	539
Ser Asp Ala Pro Ser Phe Leu Ala Phe Ile Thr Ala Trp Ser Ser	
165 170 175	
ATG AGC AAA CAC ATT GAA AAT GAA GAT GAA GAT GAA GAA TTT AAA	584
Met Ser Lys His Ile Glu Asn Glu Asp Glu Asp Glu Glu Phe Lys	
180 185 190	

TCT TTG CCA GTT TTC GAT AGA TCC GTC ATA AAA TAT CCG ACG AAA		629
Ser Leu Pro Val Phe Asp Arg Ser Val Ile Lys Tyr Pro Thr Lys		
195	200	205
TTT GAC TCC ATT TAT TGG AGA AAC GCG CTA AAA TTT CCT TTG CAA		674
Phe Asp Ser Ile Tyr Trp Arg Asn Ala Leu Lys Phe Pro Leu Gln		
210	215	220
TCT CGT CAT CCC TCA TTA CCG ACG GAC CGC ATT CGA ACC ACG TTC		719
Ser Arg His Pro Ser Leu Pro Thr Asp Arg Ile Arg Thr Thr Phe		
225	230	235
GTT TTC ACC CAA TCC AAA ATT AAG AAA TTG AAG GGT TGG ATT CAG		764
Val Phe Thr Gln Ser Lys Ile Lys Lys Leu Lys Gly Trp Ile Gln		
240	245	250
TCC AGA GTT CCA AGT TTA GTC CAT CTC TCA TCT TTT GTA GCG ATT		809
Ser Arg Val Pro Ser Leu Val His Leu Ser Ser Phe Val Ala Ile		
255	260	265
GCA GCT TAT ATG TGG GCT GGC ATA ACG AAA TCA TTC ACA GCA GAT		854
Ala Ala Tyr Met Trp Ala Gly Ile Thr Lys Ser Phe Thr Ala Asp		
270	275	280
GAA GAC CAA GAC AAC GAG GAT GCA TTT TTC TTG ATT CCG GTC GAT		899
Glu Asp Gln Asp Asn Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ile Pro Val Asp		
285	290	295
CTA AGG CCA CGA TTA GAT CCG CCG GTT CCT GAA AAT TAC TTC GGG		944
Leu Arg Pro Arg Leu Asp Pro Pro Val Pro Glu Asn Tyr Phe Gly		
300	305	310
AAC TGC TTA TCG TAC GCG CTG CCG AGA ATG CGG CGG CGA GAG CTG		989
Asn Cys Leu Ser Tyr Ala Leu Pro Arg Met Arg Arg Arg Glu Leu		
315	320	325

GTG GGA GAG AAA GGG GTG TTT CTG GCA GCT GAG GTA ATC GCG GCG	1034
Val Gly Glu Lys Gly Val Phe Leu Ala Ala Glu Val Ile Ala Ala	
330 335 340	
GAG ATA AAA AAA AGG ATC AAC GAC AAG AGA ATA TTA GAA ACG GTG	1079
Glu Ile Lys Lys Arg Ile Asn Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr Val	
345 350 355	
GAG AAA TGG TCG CCG GAG ATT CGT AAA GCG TTG CAG AAA TCA TAT	1124
Glu Lys Trp Ser Pro Glu Ile Arg Lys Ala Leu Gln Lys Ser Tyr	
360 365 370	
TTT TCG GTG GCA GGA TCG AGC AAG CTA GAT CTT TAC GGT GCA GAT	1169
Phe Ser Val Ala Gly Ser Ser Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp	
375 380 385	
TTT GGA TGG GGG AAG GCG AGA AAG CAA GAA ATA TTG TCG ATT GAT	1214
Phe Gly Trp Gly Lys Ala Arg Lys Gln Glu Ile Leu Ser Ile Asp	
390 395 400	
GGG GAG AAA TAT GCA ATG ACR CTT TGT AAA GCC AGG GAT TTC GAA	1259
Gly Glu Lys Tyr Ala Met Thr Leu Cys Lys Ala Arg Asp Phe Glu	
405 410 415	
GGA GGA TTG GAG GTT TGC TTG TCT TTG CCT AAG GAC AAA ATG GAT	1304
Gly Gly Leu Glu Val Cys Leu Ser Leu Pro Lys Asp Lys Met Asp	
420 425 430	
GCT TTT GCT GCT TAT TTT TCA CTG GGA ATT AAT GGT TAATAAATGT ATGTAATTAA	1360
Ala Phe Ala Ala Tyr Phe Ser Leu Gly Ile Asn Gly	
435 440 446	
ACTAATATTA TTATGTAACA ATTAATTAAG TGTGAGTAA CGTGAAGAAT AATCCCTATT	1420
ATATATTTAT GATTTGGTTC AAATAAAGTG TAAAGCCTCT TGAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1479

【0127】

配列番号 (SEQIDNO) : 5

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1508  
 配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)  
 鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)  
 トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)  
 配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA  
 ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No  
 アンチセンス (ANTI-SENSE) : No  
 起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : サイネリア (Senecio cruentus)  
 組織の種類 (TISSUETYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pCAT8

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TG AAC ATT CTC GAA CAT GCC CGA ATA TCG GCC CCC TCG GGC ACC	44
Asn Ile Leu Glu His Ala Arg Ile Ser Ala Pro Ser Gly Thr	
1 5 10	
ATC GGC CAT CGC TCG TTA TCT CTT ACT TTC TTC GAC ATT ACT TGG	89
Ile Gly His Arg Ser Leu Ser Leu Thr Phe Phe Asp Ile Thr Trp	
15 20 25	
CTA CTC TTC CCT CCG GTC CAC CAT CTT TTC TTC TAT GAC TTT CCA	134
Leu Leu Phe Pro Pro Val His His Leu Phe Phe Tyr Asp Phe Pro	
30 35 40	
CAT TCT AAA TCC CAT TTC ATG GAC ACT ATT GTT CCC AGG CTA AAA	179
His Ser Lys Ser His Phe Met Asp Thr Ile Val Pro Arg Leu Lys	
45 50 55	

CAA TCT TTA TCG GTC ACT CTT CAA CAT TTT TTC CCG TTT GCT AGT	224
Gln Ser Leu Ser Val Thr Leu Gln His Phe Phe Pro Phe Ala Ser	
60 65 70	
AAT TTG ATT GTA TTT CCT AAC ACT GAT GGT TCG GGT TTT AAT AAA	269
Asn Leu Ile Val Phe Pro Asn Thr Asp Gly Ser Gly Phe Asn Lys	
75 80 85	
AAA CCA GAA ATA AAA CAC GTT GAA GGT GAT TCT GTT GTG GTT ACT	314
Lys Pro Glu Ile Lys His Val Glu Gly Asp Ser Val Val Val Thr	
90 95 100	
TTT GCA GAA TGT TGT CTT GAC TTT AAT AAT TTG ACA GGA AAT CAT	359
Phe Ala Glu Cys Cys Leu Asp Phe Asn Asn Leu Thr Gly Asn His	
105 110 115	
CCT CGA AAA TGT GAA AAC TTT TAT CCA CTT GTA CCT TCA TTG GGA	404
Pro Arg Lys Cys Glu Asn Phe Tyr Pro Leu Val Pro Ser Leu Gly	
120 125 130	
AAT GCA ATC AAA TTA TGT GAT TGC GTC ACG GTC CCA CTT TTT TCA	449
Asn Ala Ile Lys Leu Cys Asp Cys Val Thr Val Pro Leu Phe Ser	
135 140 145	
CTT CAA GTG ACG TTT TTT CCG GGC TCG GGT ATA TCA CTA GGA ATG	494
Leu Gln Val Thr Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ile Ser Leu Gly Met	
150 155 160	
ACG AAT CAT CAT AGC CTT GGT GAC GCT AGC ACG CGG TTC AAC TTT	539
Thr Asn His His Ser Leu Gly Asp Ala Ser Thr Arg Phe Asn Phe	
165 170 175	
TTG AAA GGG TGG ACT TCG ATT ATT CAA TCT GGT GTA GAT CGG TCT	584
Leu Lys Gly Trp Thr Ser Ile Ile Gln Ser Gly Val Asp Arg Ser	
180 185 190	

特平 8-046534

TTT TTA ACG AAA GGA TCT CCA CCG GTT TTT GAT AGA TTG ATT AAC	629
Phe Leu Thr Lys Gly Ser Pro Pro Val Phe Asp Arg Leu Ile Asn	
195 200 205	
ATC CCA CAT TTA GAT GAA AAT AAG TTG AGA CAT ACA AGG CTC GAA	674
Ile Pro His Leu Asp Glu Asn Lys Leu Arg His Thr Arg Leu Glu	
210 215 220	
AGT TTT TAT AAA CCT TCG AGC CTT GTT GGT CCC ACT GAT AAA GTT	719
Ser Phe Tyr Lys Pro Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Asp Lys Val	
225 230 235	
CGG TCA ACG TTT GTG TTG ACC CGA ACT AAT ATC AAT CTA CTA AAG	764
Arg Ser Thr Phe Val Leu Thr Arg Thr Asn Ile Asn Leu Leu Lys	
240 245 250	
AAA AAG GTC TTA ACC CAA GTG CCA AAC TTG GAG TAC ATG TCA TCT	809
Lys Lys Val Leu Thr Gln Val Pro Asn Leu Glu Tyr Met Ser Ser	
255 260 265	
TTT ACG GTA ACT TGT GGT TAT ATA TGG AGT TGC ATA GCG AAA TCA	854
Phe Thr Val Thr Cys Gly Tyr Ile Trp Ser Cys Ile Ala Lys Ser	
270 275 280	
CTC GTA AAA ATA GGA GAA AGA AAG GGC GAA GAC GAG TTA GAA CAG	899
Leu Val Lys Ile Gly Glu Arg Lys Gly Glu Asp Glu Leu Glu Gln	
285 290 295	
TTC ATA ATC ACC ATT GAT TGT CGA TCT CGT CTT GAT CCA CCA ATT	944
Phe Ile Ile Thr Ile Asp Cys Arg Ser Arg Leu Asp Pro Pro Ile	
300 305 310	
CCC ACA GCC TAC TTT GGT AAC TGT GGT GCA CCA TGT GTC CCG ACC	989
Pro Thr Ala Tyr Phe Gly Asn Cys Gly Ala Pro Cys Val Pro Thr	
315 320 325	



特平 8-046534

TTA AAA AAT GTC GTT TTG ACT AGC GAA AAT GGG TAT GCA CTT GGT	1034
Leu Lys Asn Val Val Leu Thr Ser Glu Asn Gly Tyr Ala Leu Gly	
330 335 340	
GCT AAA GTA ATT GGA GAG TCT ATA TGC AAA ATG ATA TAT AAT AAG	1079
Ala Lys Val Ile Gly Glu Ser Ile Cys Lys Met Ile Tyr Asn Lys	
345 350 355	
GAC GGA ATC TTG AAA GAT GCC GCG AGA TGG CAT GAA CCT TTC ATG	1124
Asp Gly Ile Leu Lys Asp Ala Ala Arg Trp His Glu Pro Phe Met	
360 365 370	
ATC CCG GCT AGG AAG ATT GGT GTT GCT GGT ACA CCT AAG CTC AAC	1169
Ile Pro Ala Arg Lys Ile Gly Val Ala Gly Thr Pro Lys Leu Asn	
375 380 385	
TTG TAC GAC TTT GAT TTT GGG TGG GGG AAG CCG ATA AAG TAT GAG	1214
Leu Tyr Asp Phe Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Ile Lys Tyr Glu	
390 395 400	
ACT GTT TCA ATA GAC TAT AAT ACG TCG ATT TCT ATA AAT GCA AGC	1259
Thr Val Ser Ile Asp Tyr Asn Thr Ser Ile Ser Ile Asn Ala Ser	
405 410 415	
AAA ACA TCA GCA CAA GAT CTT GAA ATT GGA TTG AGT CTA CCG AGT	1304
Lys Thr Ser Ala Gln Asp Leu Glu Ile Gly Leu Ser Leu Pro Ser	
420 425 430	
ATG CAA ATG GAG GCG TTT TCT AGC ATC TTT GAT GAA GGA TTA GAG	1349
Met Gln Met Glu Ala Phe Ser Ser Ile Phe Asp Glu Gly Leu Glu	
435 440 445	
AGT CAA GTT TCA TTG TAGATCATCG TCCCCTTTT	1384
Ser Gln Val Ser Leu	
450 454	

特平 8-046534

GTGTGCATCA AGTTTCTGTC GTTTTTATGA GTTGCCACTG TTCTATTCTT TAAGTATACC	1444
TTTCGACTAT GTTTTGAAGA TGCAACGATA TAAATGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1504
AAAA	1508

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用を提供する

【解決手段】 リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花卉からアシル基転移酵素を精製してそのアミノ酸配列の一次構造を決定し、当該アミノ酸配列の情報に基づき、遺伝子組換え技術を用いてリンドウ由来のアシル基転移酵素に係る cDNA を単離した後、構造遺伝子の塩基配列を決定することにより目的のアシル基転移酵素をコードする遺伝子を得た。更に、遺伝子組換え技術を用いて別のリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素をコードする遺伝子を提供する。

【効果】 本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子を用いてアントシアン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアンの安定性を増すことができる。

【選択図】 なし

特平 8-046534

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人  
【識別番号】 000001904  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名	サントリー株式会社

**(USPTO) THIS PAGE BLANK**

**BEST AVAILABLE COPY**



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6  C12N 15/54, 9/10, 1/21, 5/00, A01H 5/00		A1	(11) 国際公開番号  WO96/25500
			(43) 国際公開日 1996年8月22日 (22.08.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00348 (22) 国際出願日 1996年2月16日 (16.02.96)  (30) 優先権データ 特願平7/67159 1995年2月17日 (17.02.95) JP 特願平7/196915 1995年6月29日 (29.06.95) JP 特願平8/46534 1996年1月30日 (30.01.96) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 芦刈俊彦(ASHIKARI, Toshihiko)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市高見台11番26号 Osaka, (JP) 田中良和(TANAKA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒520-02 滋賀県大津市仰木の里2丁目7番4号 Shiga, (JP) 藤原裕之(FUJIWARA, Hiroyuki)[JP/JP] 〒572 大阪府寝屋川市梅が丘1丁目8番2-203号 Osaka, (JP) 中尾正宏(NAKAO, Masahiro)[JP/JP] 〒617 京都府長岡京市竹の台1番地B1棟102号 Kyoto, (JP)		福井祐子(FUKUI, Yuuko)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町水無瀬2丁目8番2号907 Osaka, (JP) 米倉圭子(YONEKURA, Keiko)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市北柳川町15番13号209 Osaka, (JP) 水谷正子(MIZUTANI, Masako)[JP/JP] 〒615 京都府京都市西京区桂良町18番21号 Kyoto, (JP) 久住高章(KUSUMI, Takaaki)[JP/JP] 〒564 大阪府吹田市山手町2丁目12番21号402 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AU, CA, JP, KR, NZ, SG, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: GENES CODING FOR PROTEINS HAVING ACYL TRANSFER ACTIVITY			
(54) 発明の名称 アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子			
(57) Abstract			
Proteins having an aromatic-acyltransferase activity; a gene system coding for the same; a process for producing the proteins using the gene system; and uses of the genes and the proteins. The genes and the proteins acylate plant pigments such as anthocyanin to thereby cause color tone changes, thus providing plants, particularly flowers, having colors that have not been inherent therein.			

(57) 要約

芳香族アシル基転移酵素活性を有する蛋白質、これをコードする遺伝子系、及びこの遺伝子系を用いる該蛋白質の製造方法、並びに該遺伝子及び蛋白質の用途を提供する。この遺伝子及び酵素蛋白質は、植物のアントシアニン等の色素をアシル化することにより色調を変化せしめ、従来その植物が有しなかった色を有する植物、特に花を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LR	レソト	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バハマ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	SS	ス威士チ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CC	ココス（パーム）	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コートジボワール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ベトナム



## 明 細 書

アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

## 発明の属する技術分野

本発明は、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。更に詳しくは、リンドウ (Gentiana triflora var. japonica)、ペチュニア (Petunia hybrida)、シソ (Perilla ocimoides) 及びサイネリア (Senecio cruentus) 由来の芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。

## 背景技術

花産業は新規かつ種々の品種を開発することに努力している。新規な品種の育成のための有効な方法の一つとして花の色を変えることがあり、古典的な育種方法を用いて、ほとんどの商業的品種について広範囲な色を作出することに成功している。しかしながら、この方法では種ごとで遺伝子プールが制限されていることから、単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することは稀である。

花の色は主として2つのタイプの色素、即ちフラボノイド及びカロチノイドに基づき、フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与し、カロチノイドはオレンジ又は黄色の色調に寄与する。花色に主たる寄与をするフラボノイド分子はシアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びペラルゴニジンの配糖体であるアントシアンであり、異なるアントシアンが顕著な花の色の変化をもたらす。さらに花の色は無色のフラボノイドの補助発色、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液

胞の pH により影響される (Forkmann, Plant Breeding 106: 1, 1991)。

アシル化されたアントシアンは、サイネリア (Senecio cruentus) 由来のシネラリン (Goto et al., Tetrahedron 25: 6021, 1984)、ツユクサ (Commelina communis) 由来のアオバニン (Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30: 17, 1991) 及びオヤマリンドウ (Gentiana Makinoi) 由来のゲンチオデルフィン (Yoshida et al., Tetrahedron 48: 4313, 1992) を始め、自然界からの数多くの分離例が報告されている (タイマツバナ: Kondo et al., Tetrahedron 26: 5879, 1985; シソ、パンジー: Goto et al., Tetrahedron 27: 2413, 1987; シマフムラサキツユクサ: Idaka et al., Tetrahedron 28: 1901, 1987; ヤマノイモ: Shoyama et al., Phytochemistry 29: 2999, 1990; アカキャベツ、キキョウ、ロベリア、ラークスパー、チョウマメ: Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30: 17, 1991; ニンジン: Glabgen et al., Phytochemistry 31: 1593, 1992; アサガオ: Lu et al., Phytochemistry 32: 659, 1992; Saito et al., Phytochemistry 40: 1283, 1995; キランソウ、トウバナ、オドリコソウ、ラベンダー、イヌハッカ、オオキセワタ、プレクトランサス、ウツボグサ、ヒゴロモソウ、ネジリイモ: Saito and Harborne, Phytochemistry 31: 3009, 1992; オオオニバス: Strack et al., Phytochemistry 31: 989, 1992; カンパニュラ: Brandt et al., 33: 209, 1993; リンドウ: Hosokawa et al., Phytochemistry 40: 941, 1995; ヒヤシンス: Hosokawa et al., Phytochemistry 40: 567, 1995;)。

これらのアントシアンを含むフラボノイドを修飾するアシル基は構造的に 2 種類に分けられる。一つはヒドロキシ桂皮酸を中心とする芳香族アシル基であり、もう一つはマロニル基のような脂肪族

アシル基である。これらのアシル基転移反応のうち、グルコースを介して芳香族アシル基、好ましくはクマル酸やコーヒー酸が結合したアントシアンはその吸収極大が長波長側に移動することがアサガオ (*Pharbitis nil*) のアントシアン系色素を用いた実験により観察された (Dangle et al. *Phytochemistry* 34 : 1119, 1993)。

さらに、サイネリア (*Senecio cruentus*) 由来のシネラリンは 1 個の脂肪族アシル基と 3 個の芳香族アシル基を有するが、シネラリンからの芳香族アシル基の解離により、中性の水溶液中で色素の安定性が低下することが報告されている (Goto et al., *Tetrahedron* 25 : 6021, 1984)。また、リンドウ (*Gentiana makinoi*) に由来するゲンチオデルフィンはその分子内に存在する 2 つの芳香族アシル基により、サンドイッチ型の分子内スタッキングが起こり、水溶液中で色素が安定化されることが報告されている (Yoshida et al., *Tetrahedron* 48 : 4313, 1992)。さらに、吉田らは、リンドウのアントシアニンにはアントシアニンの 5 位のグルコースと 3' 位のグルコースのそれぞれにアシル基が結合していることを明らかにした (*Tetrahedron* 48, 4313, 1992)。また、シソ (*Perilla ocimoides*) の葉のアントシアニンシアニジン 3, 5-ジグルコシドの 3 位のグルコースにクマル酸が結合したシソニンであることも報告されている (*Tetrahedron Letters* 27, 2413-2416, 1978)。

しかしながら、これらの研究は有機化学的側面から天然色素の構造学的研究においてなされており、アシル基を転移する酵素を単離するなどの生化学的側面からの研究はなされていない。

また、植物におけるアントシアン系色素へのアシル基転移酵素のうち、脂肪族アシルであるマロニル基転移酵素についてはパセリの培養細胞 (Matern et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 208: 233, 1

981; Matern et al., Arch. Biochem. Biophys. 226: 206, 1983; Matern et al., Eur. J. Biochem. 133: 439, 1983) や *Cicer arietinum* の実生 (Koster et al., Arch. Biochem. Biophys. 234: 513, 1984) からのもを始めてとして多くの報告が為されている。

また、芳香族アシル基転移反応は1980年にナデシコ科の植物である *Silene* (Kamsteeg et al., Biochem. Physiol. Pflanzen 175: 403, 1980) で初めて示され、*Matthiola* の可溶化酵素画分にも同様の芳香族アシル基転移酵素活性が見い出されている (Teusch et al., Phytochemistry 26: 991, 1986)。

しかしながら、これらの報告では酵素活性の存在を示したのみに留まっており、対応する酵素蛋白質を特定したり、その一次構造やさらにはそれをコードする遺伝子についてはなんら知見が得られていない。それ以外の芳香族アシル基転移酵素についても蛋白質や遺伝子の一次構造を明らかにした報告はなく、さらにこのアントシアニン系色素のアシル化反応を花色幅の拡大に積極的に利用して花を育種した例や、アシル化を用いてアントシアニンの安定化をはかった報告もない。

一方、ペチュニア (*Petunia hybrida*) のアントシアニンの生合成経路はよく研究されており (Wiering, H. and de Vlaming, P. Inheritance and biochemistry of pigments. *Petunia*, P49-65, (1984)、Griesbach, R. J., Jansen, S. and Leonhardt, B. A., *Phytochemistry*, 30, 1729-1731, 1991)、アシル基を含むアントシアニンが存在することが知られている。ペチュニアのアントシアニンのアシル基はクマル酸あるいはカフェ酸が知られており、アントシアニンの3位のルチノシドに一分子のクマル酸又はカフェ酸が結合していて、化学構造はアントシアニンがマルビジンの場合、それぞれ3-O-(6-O-(4-O-クマロイル))- $\alpha$ -D-グルコピラノシル)-5-O- $\beta$ -D-グルコピラノ

シル- マルビジン、3-0-(6-0-(4-0-カフェオイル)- $\alpha$ -D- グルコピラノシル)-5-0- $\beta$ -D- グルコピラノシル-マルビジンであるとされていた。しかし、アシル基を2つ持つアントシアニンについての報告例はなかった。

#### 発明の開示

本発明は、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。即ち、当該利用に関しては、植物において、フラボノイド、好ましくはアントシアンへのアシル基転移反応を制御する方法が挙げられ、それにより単一種が広範囲の花色を発現する可能性を提供する。特に、芳香族アシル基の転移により、アントシアンの吸収極大が長波長側に移動することから、既存の花色に青味を持たす場合に有効であると考えられる。

これらの技術を実現化させるためには芳香族アシル基転移反応をつかさどる酵素を明らかにし、その酵素をコードするcDNAを分離する必要がある。更に、一つのアシル基転移酵素のcDNAから遺伝子の相同性を利用して他のアシル基転移酵素遺伝子の分離が可能となる。また、アシル化によりアントシアンの安定性が増すことから、安定なアントシアン色素の生産も可能となる。

本発明者らは、リンドウの花弁からアシル基転移酵素を精製し、その一次構造を決定した。更には、遺伝子組換え技術を用いてリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリアのアシル基転移酵素のcDNAを単離し、構造遺伝子の塩基配列を決定した。即ち、本発明はリンドウ、ペチュニア、サイネリアの花弁及びシソの葉に存在するアシル基転移酵素をコードしているDNA配列を提供するものである。また、本発明に係る酵素を用いてアントシアン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアンの安

定性を増すことができる。

### 具体的な記載

アシル基転移酵素をコードする遺伝子は例えば次のようにして得ることが出来る。即ち、まず、リンドウの花弁よりアシル基転移酵素を精製する。従来、本発明が成される以前に、芳香族アシル基転移酵素の精製に成功した例はなく、本発明者らは各種のクロマトグラフィー法、特にシバクロンブルー 3 G A (Cibacron Blue 3GA) を固定した樹脂 (例えば、ブルーセファロース (登録商標) 樹脂等) を用いたアフィニティークロマトグラフィー法を行うことにより初めて当該酵素の精製に成功した。

次に、常法に従ってアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列を解明し、それらのアミノ酸配列に対応する合成ヌクレオチドを作製する。

一方、同じリンドウの花弁より p o l y A + R N A を抽出し、常法により、2 本鎖 c D N A を合成し、更に c D N A ライブラリーを作製する。前述の 2 本鎖 c D N A を鋳型にし、前述の合成 D N A と c D N A を合成する際に使用した合成 D N A プライマーを用い、P C R 法により、アシル基転移酵素遺伝子に特異的な D N A 断片を取得する。次に、この D N A 断片をプローブにして、前述の c D N A ライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを得る。そして、このクローンから回収されるプラスミド D N A を分離し、D N A 塩基配列を決定する。更に精製したアシル基転移酵素の分析により得られたアミノ酸配列と D N A 塩基配列から推定したアシル基転移酵素のアミノ酸配列とを比較することにより、陽性クローンが求める c D N A クローンであることを確認する。

また、本発明者らは、ペチュニア品種サフィニアパープル (サン

トリー（株））の花色が通常の赤紫から紫に変化した変異株（V M）を見いだし、アントシアニンの構造決定を、例えば吉田らの文献（Yoshida et al., Tetrahedron 48 ; 4313, 1992）に記載の方法に従って行った。

本発明の DNAとしては、例えば配列番号：1～6のいずれかに記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、除去及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、除去及び／又は他のアミノ酸により置換されている修飾されたアミノ酸配列を有し、なお、芳香族アシル基転移活性を維持している蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

本発明はまた、配列番号：1～6のいずれかに記載の塩基配列又はその部分、例えばコンセンサス領域の6個以上のアミノ酸をコードする部分に対して、例えば2ないし5×SSC，50℃の条件下でハイブリダイズし、且つ芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関する。なお、最適なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその長さにより異なり、塩基配列が短くなるに従ってハイブリダイゼーション温度は低くするのが好ましく、例えばアミノ酸6個をコードする塩基配列（18塩基）の場合は、50℃以下の温度が好ましい。本発明はさらに、配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して15%以上、好ましくは25%以上、例えば30%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関する。

生来の塩基配列を有する DNAは、実施例に具体的に記載するよう

に、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングにより得られる。

また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードする DNAは、生来の塩基配列を有する DNAを基礎にして、常用の部位特定変異誘発や PCR法を用いて合成することができる。例えば、修飾を導入したい部位を含む DNA断片を、上記により得られたcDNA又はゲノミック DNAの制限酵素消化により得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特定変異誘発又は PCR法を実施し、所望の修飾を導入した DNA断片を得、これを、目的とする酵素の他の部分をコードする DNAに連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列を有する酵素をコードする DNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードする DNAを、所望の制限酵素により切断し、得られた DNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合には、不足部分を合成 DNAを連結することにより補えばよい。

また、このクローンを大腸菌及び酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がアシル基転移酵素をコードしていることを確認し、アシル基転移酵素遺伝子の翻訳領域を明らかにすることにより本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子が得られ、更に、当該遺伝子を発現させることにより遺伝子産物である目的のアシル基転移酵素蛋白を得ることができる。

あるいはまた、配列番号 1～6 のいずれかに記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、前記蛋白を得ることができる。

従って本発明はまた、前記の DNAを含んでなる組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主としては、原核生物又は真核生物を用いることができる。



。原核生物としては、細菌、例えばエシェリヒア (Escherichia) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (Escherichia coli)、バシルス (Bacillus) 属微生物、例えばバシルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、等常用の宿主を用いることができる。

真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母又は糸状菌が使用できる。酵母としては、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (Aspergillus) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、ペニシリウム (Penicillium) 属微生物等が挙げられる。さらに、動物細胞又は植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、又はカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターは、それらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーター及びターミネーター、複製起点等を含む。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばtrc プロモーター、tac プロモーター、lac プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trp C等が使用される。また、動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。

発現ベクターの作製は、制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換

も、常法に従って行うことができる。

前記蛋白質の製造方法においては、前記の発現ベクターにより形質転換された宿主を培養、栽培又は飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする蛋白質を回収、精製することができる。

なお、本明細書においてはリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素について述べているが、当該酵素の精製法をそのまま又は一部を改変して、他の植物のアシル基転移酵素を精製し、当該酵素に係るアミノ酸配列を決定することにより、当該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることができる。更に、本発明に係るリンドウ由来のアシル基転移酵素の cDNA をプローブとして用いることにより、リンドウから別のアシル基転移酵素の cDNA、ペチュニアから別のアシル基転移酵素の cDNA を得ることができた。従って、アシル基転移酵素の遺伝子の一部または全部を用いると、他のアシル基転移酵素遺伝子を得ることができる。また、これらのアミノ酸配列を比較したところ、保存されているアミノ酸配列があった。この領域を用いて、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素の cDNA を得ることに成功したが同様の手法を用いることにより、他の植物に応用し、類似のアシル基転移酵素の cDNA 又は染色体 DNA クローンを得ることが可能である。

また、本明細書において示したように、リンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリア由来のアシル基転移酵素を精製し、常法に従って当該酵素に対する抗体を得ることにより、その抗体と反応する蛋白質を作る cDNA 又は染色体 DNA をクローニングすることができる。従って、本発明はリンドウ、ペチュニア、シソ及びサイネリ

ア由来のアシル基転移酵素の遺伝子のみに限定されるものではなく、広く芳香族アシル基転移酵素に関するものである。

さらに本発明は、アシル基転移酵素の遺伝子を導入することにより、色が調節された植物もしくはその子孫又はそれらの組織に関するものであり、その形態は切花であってもよい。

また、本明細書においてはアントシアンを含むフラボノイドのアシル基転移反応において、アシル基の供与体としてp-クマロイル-CoA又はカフェオイル-CoA等のCoAエステルを挙げたが、p-クマロイル、フェルロイル又はシナポイル-1-O-グルコースといったハイドロキシシンナモイル-1-O-グルコースも芳香族アシル基の供与体としての利用が可能であるので (Glassgen and Seitz, *Planta* 186: 582, 1992)、本発明に係る酵素を用いた利用が可能である。

## 実施例

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。実験の手順は特に記述しない限り Sambrookらの *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

### 実施例 1. 植物からのアシル基転移酵素の検索

#### (1) 基質の調製

デルフィニジン 3, 5-ジグルコシドおよびシアニジン 3, 5-ジグルコシドはバーベナ (*Verbena hybrida*) の一品種であるタピアンバイオレット (サントリー (株) より購入可能) の花卉からそれぞれのジアセチル体を抽出し、脱アセチル化することにより取得した。タピアンバイオレットの花卉 (348 g) を液体窒素とともにホモジナイザーで摩砕し、50% (v/v) アセトニトリル、0.2% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液 1.5 L に浸して3日間

放置した。

濾紙上にケイソウ土（＃１００）を敷き詰めて吸引ろ過し、ロータリーエバポレーターで約半分量に濃縮して、ＨＰ－２０（ファルマシア社）にて、ゲル濾過を行った。８００ｍｌの蒸留水で洗浄後、５０％アセトニトリル、０．１％ＴＦＡ　８００ｍｌで色素画分を溶出した。エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して、粗色素（７．３ｇ）を得た。

タピアンの主色素はデルフィニジン及びシアニジンの３，５－ジアセチルグルコシドであるため、以下の脱アセチル化操作を行った。粗色素１ｇをメタノール５０ｍｌに溶解し、窒素ガスを１５分間通気して溶存酸素を除いた後、氷冷した。

一方で、１Ｎ水酸化ナトリウム５０ｍｌから同様に溶存酸素を除き、氷冷下で先の色素溶液に攪拌しながら滴下し、更に３０分間攪拌して加水分解反応をさせた。６Ｎ塩酸１ｍｌを加えて反応を停止させ、蒸留水５ｍｌを加えてエバポレーターで約半量に濃縮し、終濃度１０％になるようにメタノールを加えて２ｍｌずつＳｅｐ　Ｐａｃ　Ｃ１８カラム（ウォーターズ　アソシエーション社）にアプライし、蒸留水５ｍｌで洗浄した後、３０％アセトニトリル、０．６％ＴＦＡ２ｍｌで溶出させた。

溶出液をすべて集めてエバポレーターで濃縮し、ＨＰＬＣによる分取を行った。ＤＥＶＥＬＯＳＩＬ　ＯＤＳ－１０／２０（５０×３００ｍｍ；野村化学（株））カラムを用い、１２０分間でＴＦＡが０．１％から０．３％、アセトニトリルが１０％から３０％の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分３２ｍｌの流速で０．５分毎に分取し、各画分の色素画分の吸収スペクトルを測定して、デルフィニジン３，５－ジグルコシドおよびシアニジン３，５－ジグルコシドを分離してそれぞれを濃縮、凍結乾燥した（デルフィニジン３

、5-ジグルコシド 75 mg、シアニジン 3, 5-ジグルコシド 50 mg)。各々を 1.5 mg/ml になるように 0.5% TFA に溶解して、使用するまで -80℃ に保存した。

もう一方の基質であるヒドロキシシンナモイル-CoA の合成は以下の方法で行った。最初に、文献 (Stockigt and Zenk, Z. Naturforsch. 30: 352, 1975) に従ってカフェ酸 (ナカライテスク社) と N-ヒドロキシスクシンイミド (メルク (Merck) 社) よりエステルを合成した。このエステル 0.5 mmol を 2 ml のアセトンに溶解し、一方でコエンザイム A (CoA: KOHJIN) 0.1 mmol と炭酸水素ナトリウム 1 mmol とを 20 ml の水に溶解して、これに先のエステル溶液を 1 滴ずつ加えた。

攪拌しながら窒素ガスの下で室温で一晩反応させた後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、遠心 (27000 × g、10 分) によって不溶物を除いて、HPLC で目的の生成物を分取した。DEVELO SIL ODS-10/20 (50 × 300 mm; 野村化学 (株)) カラムを用い、0.1% TFA 存在下でアセトニトリルが 40 分間で 18% から 36% の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分 32 ml の流速で 0.8 分毎に分取し、各画分の吸光スペクトル (200 ~ 400 nm) を調べて 344 ~ 348 nm に極大吸収を持つ画分をカフェオイル CoA 画分として集めた。それらをロータリーエバポレーターで濃縮した後、同じカラムで再び分離した。

但し、アセトニトリル 18%、TFA 0.1% の等濃度クロマトグラフィーで分離を行い、同様に吸光スペクトルを調べて、目的の化合物を含む画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。この方法で 35 μmol の生成物が得られた。また、上記の方法中カフェ酸のかわりにクマル酸を用いることにより p-クマロイル-CoA が合成でき 2 mg/ml になるように蒸留水に溶解し

て、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。

## (2) 粗酵素液の抽出方法

酵素を抽出する植物組織（花卉や食用部分等）3 gを液体窒素で凍結させて乳鉢上で磨砕した。10 mlの抽出用緩衝液（100 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）、10 mMアスコルビン酸ナトリウム、14 mM 2-メルカプトエタノール）を加えて更に磨砕し、ガーゼ3層で濾過した。DOWEX（1-X2、100-200 mesh；室町化学工業（株））3 gを添加して10分間攪拌した後に吸引ろ過によって樹脂を除去し、遠心分離（ $27000\times g$ 、20分）によって植物体残査を除いた。70%飽和硫酸で塩析を行い、タンパク質を沈殿させた。沈殿を1 mlの溶解用緩衝液（20 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）、14 mM 2-メルカプトエタノール）に懸濁し、遠心分離（ $27000\times g$ 、5分）によって不溶物を除去した後、溶解用緩衝液で平衡化させたSephadex G-25カラム（NAP-10；ファルマシア社）を用いて脱塩した溶液を粗酵素液として用いた。

## (3) 酵素活性の測定方法

100 mM リン酸緩衝液（pH 8.5）、デルフィニジン3, 5-ジグルコシド 24 nmol、カフェオイル-CoA 21.5 nmol、及び酵素液20  $\mu\text{l}$ を含む反応液50  $\mu\text{l}$ を $30^{\circ}\text{C}$ で10分間反応させた。13.8%（v/v）酢酸を含むアセトニトリル50  $\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させ、遠心分離（ $18000\times g$ 、5分）によって不溶物を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。分析はC18逆相カラム（YMC-Pack ODS-A、 $6.0\times 150\text{ mm}$ ；ワイエムシ社）を用い、21.6%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸を毎分1 mlの流速で流し、反応液20  $\mu\text{l}$ を分析した。化合物の検出には

三次元クロマトグラフィーシステム（CLASS-LC10；（株）島津製作所）を使用し、生成物は、基質にはない330nm付近に極大吸収をもつこと、及び可視部の吸収極大値が519nmから525nmへと約6nm長波長側に移動していることから、アシル基（カフェ酸）が結合し、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドが生成していることを確認した。

520nmの波長で検出し、基質（デルフィニジン3，5-ジグルコシド）と生成物（デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド）とのピーク面積の和に対する生成物のピーク面積の比を求め、生成物のモル数を計算して酵素活性（kat）とした。このHPLC分析における各化合物の展開時間は次の通りである。カフェオイル-COA：6.3分、デルフィニジン3，5-ジグルコシド：3.3分、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド：5.3分。

但し、この反応条件下においては反応液中のデルフィニジン3，5-ジグルコシドがアシル基転移酵素により、カフェ酸で修飾されることにより、反応液の色が濃青色から赤紫色に変化するため、簡便な方法として、マイクロタイタープレート中にて反応を行い、色の変化によって酵素活性を調べることができる。

なお、反応後のプレートを室温で長期間（1日～1週間）放置すると、アシル化されていないデルフィニジン3，5-ジグルコシドは無色化するのに対して、酵素の働きによってアシル化されたデルフィニジン3，5-ジグルコシドでは赤紫色が残ることから、デルフィニジン3，5-ジグルコシドがアシル化されることによって中性からアルカリ性の水溶液中での安定化が認められた。同様にシアニジン3，5-ジグルコシドを基質とした場合も反応液の色が赤紫色から濃青色に変化し、色素が安定化することから、簡易的酵素ア

ッセイ方法での酵素活性の検出が可能である。

一方、カフェオイル-C o A のかわりに p-ークマロイル-C o A を基質とした場合もアシル化による色の変化及びアントシアニンの安定化が認められるが、色調の変化の度合いはカフェオイル-C o A の場合に比べ少ない。

#### (4) アシル基転移酵素の検索

各種の植物（リンドウ、アイリス、デルフィニウム、ストック、トルコキキョウ、ナデシコ、スイートピー、ラークスパー、パンジー、サイネリア（以上、花卉）、赤キャベツ、赤タマネギ、金時ニンジン、西洋ニンジン、ムラサキイモ、シソ（以上、食用部分）及びナス（果実上皮部分））から上記の方法によって粗酵素液を抽出し、酵素活性を測定したところ、トルコキキョウ、ナデシコ及び、リンドウに各々 0.63、0.0012 及び 21.8 nkat/mg 蛋白質のアシル基転移活性が認められた。抽出タンパク質当たりのアシル基転移酵素活性が最も高いリンドウを酵素精製の材料として用いることにした。

なお、タンパク質濃度の定量には Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad 社) を用いた。

#### 実施例 2. リンドウ由来のアシル基転移酵素の精製

##### (1) 酵素の精製

エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花卉から酵素の精製を行った。以下の実験は記載がない限り、0～4℃で行った。エゾリンドウの花卉 3 kg を液体窒素存在下でエクセル・オート・ホモジナイザー (DX-3; 日本精機製作所) を用い磨砕した。8 L の抽出用緩衝液 (100 mM トリス塩酸 (pH 7.0)、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、10 μM p-アミジノフェニルフッ化メタンスルフォニル塩酸塩 (p-APMSF; 和光純薬



工業（株））、5 mM ジチオスレイトール（DTT；ナカライテスク社）とポリクラールSB-100（和光純薬工業（株））500 gを加えてポリトロンで完全に粉碎した。

粉碎液をガーゼ4層で搾ったのち、さらに遠心分離（11000 × g、30分）して細胞残渣を除去した。40%飽和硫酸で塩析を行い、不溶物を除去した後に70%飽和硫酸で再び塩析を行った。沈殿を250 mlの溶解用緩衝液（20 mM トリス塩酸（pH 7.0）、10 μM p-APMSF、1 mM DTT）に懸濁し、遠心分離によって不溶物を除去した後、同緩衝液で平衡化させたSephadex G-25（95 × 110 mm；ファルマシア社）のカラムを用いて脱塩した。蛋白質を含む画分を集め（860 ml）、以下のクロマトグラフィーに供した。

なお、Q-Sepharose Fast Flow、HiTrap Blue及びPhenyl Superoseの各クロマトグラフィーは室温でFPLCシステム（ファルマシア社）を用いて行った。

まず、溶解用緩衝液で平衡化させたQ-Sepharose Fast Flow（26 × 100 mm；ファルマシア社）にアプライし、同じ緩衝液で十分に洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を60分間で0 Mから0.4 Mに変化させる直線勾配により溶出させた（8 ml/min）。酵素活性のある画分を集めた（130 ml）後、アフィニティークロマトグラフィーを行った。溶解用緩衝液で平衡化させたHiTrap Blue（5 ml、16 × 25 mm；ファルマシア社）を3本直列に繋いだカラムにアプライし、同緩衝液で十分に洗浄した後、1 M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出させた。活性画分を70%飽和の硫酸で塩析し、蛋白質の沈殿を得た。

この沈殿物を1 mlの溶解用緩衝液に懸濁して遠心分離によって

不溶物を除いた後、溶解用緩衝液で平衡化させた S e p h a c r y  
l S - 2 0 0 ( 2 5 × 1 1 5 0 m m ; ファルマシア社) にアプ  
ライした。毎分 0 . 2 m l の流速で、約 3 m l ずつ分取し、再び活性  
画分を集めて ( 2 7 m l ) 、 1 M になるように硫酸を加えた。十分  
に攪拌した後、遠心分離 ( 3 9 0 0 0 × g 、 1 0 分 ) により不溶物  
を除去し、 1 M 硫酸を含む溶解用緩衝液で平衡化させた P h e n y  
l S u p e r o s e 5 / 5 ( 5 . 0 × 5 0 m m ; ファルマシア  
社) にアプライした。

毎分 0 . 5 m l の流速で、十分に洗浄した後、硫酸濃度を 6 0 分  
間で 1 M から 0 M に直線的に下げることにより蛋白質を流出させた  
。 0 . 5 m l ずつ分取した各画分の酵素活性を測定し、 S D S - ポ  
リアクリルアミドゲル電気泳動 ( 1 0 % アクリルアミドゲル ; 第  
一化学 ( 株 ) ) で分析した結果、ほぼ単一の蛋白質として分子量約  
5 0 , 0 0 0 のバンドが認められ、且つこの蛋白量と活性との相関  
が認められることから、この蛋白質が目的のアシル基転移酵素であ  
ると断定した。更に単一標品を得るために活性を持つ画分 ( 1 2 m  
l ) を逆相 H P L C により精製した。

カラムは D E V E L O S I L 3 0 0 C 4 - H G - 5 ( 4 . 6 ×  
2 5 0 m m ; 野村化学 ( 株 ) ) を用い、毎分 1 m l の流速で、トリ  
フルオロ酢酸 0 . 1 % 存在下、 3 0 分でアセトニトリル濃度を 4 0  
. 5 % から 5 6 . 7 % の直線濃度勾配で変化させることにより溶出  
させた。 2 8 0 n m の吸収をモニターしながら 1 m l ずつ分画し、  
さらに各画分を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し  
て分子量約 5 0 , 0 0 0 の蛋白質を含む画分を集めた。この H P L  
C 操作を 3 0 回繰り返し、スピードバック ( サバント社 ) で濃縮す  
ることにより約 0 . 2 m g の単一蛋白質標品を得ることができた。

## ( 2 ) 精製蛋白質の分析

500 pmolの精製標品をアミノ酸シーケンサー（P S Q - 1 ; (株) 島津製作所）に供したところ、エドマン分解の第一段目で200 pmolのグルタミン酸、更に第二段でも90 pmolのグルタミン酸が検出されたが、三段目以降は判読不能であったため、本酵素のN末端は何らかの形でブロックされていると考えられた。

しかしながら、N末端がグルタミン酸である場合にはピログルタミル基が生じ、エドマン分解によるシーケンスでは上述のような結果を示すことが知られていることから本酵素のN末端はグルタミン酸である可能性が高い。

残りの沈殿を80  $\mu$ lの45 mMトリス塩酸（pH 8.5）、3.6 M尿素、0.09% SDSを含む溶液に溶解し、リシルエンドペプチダーゼ（L y s y l E n d o p e p t i d a s e : Achromobactor lyticus 由来 ; 和光純薬工業（株））16 pmolを加えて、37℃で6時間反応させた。反応液をそのままDEVELO SIL 300 C4-HG-5カラムで分離した。

分離条件は、0.1%トリフルオロ酢酸のもと、70分でアセトニトリル濃度が0%から80%の直線濃度勾配、毎分0.7 mlの流速で、210 nmの吸収をモニターしながら吸収のピーク画分のみを分取した。得られた13本のピーク画分のうち、アセトニトリル濃度が32%から40%の時点で溶出されたピーク画分の3本を、スピードバックによる濃縮後、さらにODSカラム（DEVELO SIL 300 ODS-HG-5 ; 野村化学（株））を用い、先と同じ条件で分離及び精製を行った。

各ピーク画分をスピードバックで濃縮・乾固させ、40%アセトニトリル30  $\mu$ lに溶解させ、アミノ酸シーケンサーに供した。その結果6本のペプチドのアミノ酸配列を判読することができた。

以下に、各々のペプチドのアミノ酸配列を示す（アミノ末端からカルボキシル末端の方向に示す）。

アミノ酸配列（A T 7 3）；Arg-Phe-Leu-Gly-Ile-Thr-Gly-Ser-Pro-Lys（配列番号：7）

アミノ酸配列（A T 7 2）；Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys（配列番号：8）

アミノ酸配列（A T 7 4 1 - 1）；Gly-Val-Glu-Ile-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Lys（配列番号：9）

アミノ酸配列（A T 7 4 1 - 2）；Ala-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Leu-Lys（配列番号：10）

アミノ酸配列（A T 9）；His-Tyr-Val-Pro-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Leu-Met-Pro-Ile-Lys（配列番号：11）

アミノ酸配列（A T 8 3）；Val-Arg-Ala-Thr-Tyr-Val-Leu-Ser-Leu-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys（配列番号：12）

### 実施例 3. リンドウ由来のアシル基転移酵素の c D N A クローニング（1）

#### （1）c D N A ライブラリーの作製

市販されているリンドウ（Gentiana triflora var. janonica）から花卉を集め、液体窒素中で乳鉢で磨碎した。この磨碎物から、グアニジンチオシアネート／塩化セシウムを用いる方法により R N A を得、オリゴテックス（日本ロッシュ）を用い、製造者が推奨する方法にて、p o l y A + R N A を得た。グアニジンチオシアネート／塩化セシウムを用いる方法は、R. McGookin, Robert J. Slater らの、Methods in Molecular Biology vol 2, (Humana Press Inc. 1984) に詳細に示されている方法に従った。

得られた p o l y A + R N A を鋳型とし、Z A P - c D N A 合成キット（ストラタジーン社製）を用いて 2 本鎖 c D N A を合成し

、ファージベクター  $\lambda$  ZAP II へのクローニングを行った。更に、同社の Gigapack II Gold Packaging Extract キットを用いて、当該キットに記載された方法で cDNA ライブラリーを作製した。

### (2) 合成 DNA プライマーの設計

実施例 2 で得られた部分アミノ酸配列のうち、Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys (配列番号：13) で示される配列は、リジルエンドペプチダーゼの特異性を考えると、Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys (配列番号：14) であると考えられる。この配列の中のアミノ酸配列；Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala (配列番号：15) で示される部分を用いて、以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

ヌクレオチドの配列 (オリゴ 1) ; 5'-AARATHCAYATGGAYGCITTYGC-3' (配列番号：16)

但し、特に記載のないかぎり、核酸の配列は IUPAC-IBU 準拠の核酸コード表に従って一文字で表記する。即ち、A：アデニン、C：シトシン、G：グアニン、T：チミン、Y：C 又は T、R：A 又は G、H：A 又は C 又は T、及び I はイノシンを示す。

また、先に述べた cDNA ライブラリー作製時に使用したプライマーをもとに以下の他のオリゴヌクレオチドも合成した。

ヌクレオチドの配列 (オリゴ 2) ; 5'-CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (配列番号：17)

### (3) アシル基転移酵素遺伝子断片のクローニング

リンドウの花弁の RNA に由来する 2 本鎖 cDNA 約 0.1  $\mu$ g を鋳型にオリゴ 1 とオリゴ 2 をプライマーとして、PCR 反応を行った。反応はポリメラーゼチェーン反応キット Gene Amp (宝酒造 (株)) を用いて、95℃ 1 分、45℃ 1 分、72℃ 2 分を

1 サイクルとし、35 サイクル行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約400bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、その10ngをDIG-ヌクレオチド混合液（ベーリンガー社）と合成ヌクレオチドIとIIを用いて、前述のPCR反応を25サイクル行い、DIGで標識したDNA断片を得た。

#### （4）アシル基転移酵素のcDNAのクローニング

上記のようにして得られたλファージライブラリーを大腸菌XL1-Blue株（ストラタジーン社）に感染させ、1プレート当たりプラーク5万個を含む5枚のプレート（直径13.5cm）をスクリーニングした。

ファージをフィルター（Hybond N+、アマーシャム社）に吸着させ、製造者の推奨する方法で処理した後、このフィルターをハイブリダイゼーションバッファー（5×SSC、50%ホルムアミド、50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.0）、7%SDS、2%Blocking reagent（ベーリンガー社）、0.1%ラウロイルサルコシン、80mg/mlサケ精子DNA）中で42℃で1時間保持した。DIG標識した前述のDNA断片をハイブリダイゼーション液中に加え、さらに16時間のインキュベーションを行った。

洗浄液（0.2×SSC、0.1%SDS）でフィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼで標識されたDIG特異的な抗体による酵素免疫測定法（ベーリンガー・マンハイム株式会社）により5-ブロモ4-クロロ3-インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって検出した。検出方法は製造者による使用説明書に従った。

この結果、数十個の陽性クローンが得られ、うち20クローンを

ストラタジーン社の推奨する方法で、cDNAをプラスミドpB1uescript SK<sup>+</sup>上に回収した。アガロースゲル電気泳動でcDNAの挿入を調べたところ、全てのクローンにおいて各種サイズのcDNAの挿入が認められ、そのうち最長のものは1.7 kbであった。それらのうちから適当に9クローンを選び制限酵素による解析を行ったところ、サイズは異なるが全てのクローンで同様の制限酵素パターンを示した。

#### (5) 塩基配列の決定

得られたクローンからプラスミドを抽出し、ABI 373A・DNAシーケンサー（パーキンエルマー社）を用い、同社の推奨する蛍光試薬によるダイデオキシシーケンス法で、前述の9クローンのうち全長を含むと考えられる6つのクローン（pGAT2、pGAT3、pGAT4、pGAT7、pGAT8及びpGAT11）についてcDNAの5'側の塩基配列を決定した。

その結果、これらのクローンは互いに同じ塩基配列を持っており、cDNAの長さが異なるものと考えられた。これらのクローンのうちpGAT4の全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Kilo-Sequence用 Deletion Kit（宝酒造（株））を用いて、一連の欠失クローンを得た後、各々のクローンを用いて上述の方法により行った。

#### (6) 塩基配列とアミノ酸配列の比較

pGAT4に挿入されたcDNAは1703塩基でありその中に1410塩基（終止コドンを含む）からなるオープンリーディングフレーム（ORF）が見い出された。この配列を配列表・配列番号1に示す。実施例2で明らかになったアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列の全てがORF中のアミノ配列として存在することから、クローニングされたcDNAは、リンドウ由来のアシル基転移酵素

遺伝子であると結論した。開始コドンについては、アミノ末端の解析からグルタミン酸がアミノ末端の残基であると推測されたので、cDNAの塩基配列の上で、5'側から最初のATGが開始コドンであると推察した。

一方、pGAT8に係るcDNAは、5'側がpGAT4よりも7塩基短いため、完全長のcDNAではないと考えられた。

#### 実施例 4. 大腸菌における遺伝子の発現

##### (1) 発現プラスミドの構築

大腸菌でのアシル基転移酵素遺伝子の発現には、大腸菌の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）を用いた。このpTrc99Aはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）で誘導可能な大腸菌のtrcプロモーターを含み、その下流に目的遺伝子を挿入することにより、大腸菌での遺伝子発現が可能になる。

また、制限酵素NcoI部位が開始コドンであるATG配列を利用して導入されており、NcoI部位で組換えることにより、目的遺伝子の開始コドンからの直接発現が可能である。

pGAT4を当該ベクター内に存在する制限酵素部位EcoRIとKpnIで消化して得られる約1.8kbのDNA断片（配列表・配列番号1記載の塩基配列を全て含む）を前述のpTrc99AのEcoRI、KpnI部位に組換えることにより、pGAT101を構築した。

アシル基転移酵素の開始コドン近傍にNcoI部位の導入を行うために、開始コドン近傍、及びアシル基転移酵素遺伝子内部（開始コドンから300塩基目付近）に対応する以下の2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

オリゴヌクレオチド（GAT-NcoI）；5'-TTCACCATGGAGCAA



ATCCAAATGGT-3' (配列番号 : 18)

オリゴヌクレオチド (G A T - S c a I) ; 5' -CGAGTCGCCCTCATC  
AC-3' (配列番号 : 19)

10 ng の p G A T 4 を鋳型とし、上記のオリゴヌクレオチドをプライマーとして P C R 反応を行った。反応はポリメラーゼチェイン反応キット G e n e A m p (宝酒造 (株)) を用いて、95℃ 1 分、56℃ 1 分、72℃ 2 分を 1 サイクルとし、15 サイクル行い、得られた反応物を 1 % アガロース電気泳動したところ、約 300 bp の特異的な D N A 断片が観察された。この D N A 断片を回収し、制限酵素 N c o I と A a t I で切断後、p G A T 101 を N c o I と A a t I で切断して得られる約 6 kb の断片と連結することにより、p G A T 102 を構築した。P C R 法により増幅した部分の塩基配列は p G A T 102 構築後に p G A T 4 と同じであることを確認した。

## (2) アシル基転移酵素遺伝子の大腸菌での発現

p G A T 102 で大腸菌 M M 294 (supE44 hsdR endA1 pro thi) (Meselson and Yuan, Nature, 217, 1110-, 1968) を形質転換した。なお、ここで形質転換される宿主は、形質転換用の宿主として利用可能な大腸菌であれば特に特定されるものではなく、遺伝子組換えに一般に用いられ、当業者が容易に入手できるその他の株 (例えば、J M 109 や D H 5 等) を利用することができる。また、大腸菌の形質転換方法は H a n a h a n の方法に従った (J. Mol. Biol., 166, 557-, 1983)。形質転換された大腸菌をアンピシリン (50 µg/ml) を含む 2 ml の L B 培地 (トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10 g を 1 リッターの蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 7.2 に調整する) に植菌し、37℃で一晩培養した。

この培養液 1 m l を 1 0 m l の M 9 培地（リン酸一水素ナトリウム 0. 6 %、リン酸二水素カリウム 0. 3 %、塩化ナトリウム 0. 5 %、塩化アンモニウム 0. 1 %、グルコース 0. 5 %、硫酸マグネシウム 1 m M、ビタミン B 1 4  $\mu$  g / m l、p H 7. 2）にカザミノ酸 0. 5 %とアンピシリン 5 0  $\mu$  g / m l を加えた培地に接種し、3 7 °C で 3 時間培養後、0. 5 M の I P T G を 4 0  $\mu$  l 添加（終濃度 2 m M）し、更に 5 時間培養を続けた。集菌後、3 0 m M 塩化ナトリウムを含む 3 0 m M トリス塩酸バッファー（p H 7. 5）で洗浄し、洗浄菌体を同じバッファー 1 m l に懸濁した。1 m g リゾチーム、0. 2 5 M E D T A を 2 5  $\mu$  l 加えて 3 0 分間 0 °C に放置した後、凍結・融解を 3 回繰り返して菌体を破壊した。

これを 1 5 0 0 0 r p m、3 0 分間遠心をして得た上清を粗酵素液とし、実施例 1（3）で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、p G A T 1 0 2 を導入した大腸菌ではアシル基転移反応が確認されたので、H P L C による分析を行った。

その結果、p G A T 1 0 2 を導入した大腸菌では 2 4 n m o l のデルフィニジン 3, 5 - ジグルコシドと 2 1. 5 n m o l のカフェオイル - C o A から 1 8. 3 n m o l のデルフィニジン 3 - グルコシル 5 - カフェオイルグルコシドの生成が認められた。

この結果と、リンドウのアントシアニンにおいては 5 位と 3' 位のグルコースにアシル基が結合しているという既知の事実と併せて考えると、p G A T 4 がコードするアシル基転移酵素はアントシアニン 3, 5 - ジグルコシドの 5 位のグルコースにアシル基を転移する反応を触媒することが判った。

また、大腸菌で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化され

たデルフィニジン 3, 5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

#### 実施例 5. 酵母における遺伝子の発現

##### (1) 酵母の発現ベクター

酵母の発現ベクターは、特開平 4-228078 に記載の pY E 22 m を使用した。

##### (2) アシル基転移酵素遺伝子の酵母での発現

pGAT 4 又は pGAT 8 を当該各ベクター内に存在する制限酵素部位 EcoRI と KpnI で消化して得られる約 1.8 kb の DNA 断片と pY E 22 m を同じく EcoRI と KpnI で消化して得られる約 8 kb の DNA 断片を連結して酵母発現プラスミド pY GAT 4 と pY GAT 8 を各々構築した。pY GAT 4 は第 1 番目のメチオニンからの翻訳を行うが、pY GAT 8 では分離した cDNA の 5' 側の一部が欠けているため、アシル基転移酵素の翻訳開始メチオニン（配列表・配列番号 1 におけるアミノ酸配列番号；-1）ではなく、次のメチオニン（配列表・配列番号 1 におけるアミノ酸配列番号；5）からの翻訳が行われる。

これらの酵母発現プラスミドでは、アシル基転移酵素をコードしている cDNA は酵母の構成的なプロモーターのひとつであるグリセロアルデヒド-3 リン酸脱水素酵素のプロモーターの下流に連結されており、同プロモーターにより転写が制御されている。

伊藤らの方法 (Ito et al. J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) を用い pY GAT 4 及び pY GAT 8 で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G1315 (Ashikari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989) を形質転換した。形質転換された酵母はトリプトファンの合成能の回復により選択した。

なお、ここで形質転換に用いる酵母の宿主は特に限定されるものではなく、TRP1遺伝子が不完全なためにトリプトファンの要求性を示す株であれば何れのものでも用いることができる（例えば、イースト・ジェネティック・ストック・センターより購入可能（Yeast Genetic Stock Center ; Berkeley, CA, USA ; カタログ第7版（1991年）第36頁））。

得られた形質転換株を10mlの1%カザミノ酸（Difco社）を含むバークホルダー培地（Burkholder, Amer. J. Bot. 30, 206-210）にて、30℃で40時間振盪培養した。併せて、対照実験のために、トリプトファンの合成能を自然に回復した酵母も同様に培養した。

これらを集菌後、同量の菌体破碎用バッファー（30mM トリス塩酸 pH 7.5、30mM 塩化ナトリウム）で洗浄し、さらに1mlの同じバッファーにサスペンドし、1.5mlのエッペンドルフチューブに移した。遠心分離後、上清を除き0.4mlの同じバッファーで沈殿菌体を再度サスペンドし、400mgのグラスビーズ（Glass Beads 425-600microns Acid-Wash、シグマ社）を加えて激しく振盪することにより、酵母菌体を破碎した。

遠心分離後の上清を粗酵素液とし実施例1（3）で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pYGAT4及びpYGAT8を導入した酵母は何れもアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。なお、対照に用いた酵母ではアシル基転移活性は認められなかった。

その結果、pYGAT4及びpYGAT8を導入した酵母では2

4 nmol のデルフィニジン 3, 5-ジグルコシドと 21.5 nmol のカフェオイル-CoA から各々 16.6 nmol と 20.9 nmol のデルフィニジン 3-グルコシル 5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。pYGA T4 と pYGA T8 から生産される蛋白質はそのアミノ末端が異なるが、ともにアシル基転移酵素活性を保持していた。

また酵母で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン 3, 5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

#### 実施例 6. リンドウ由来のアシル基転移酵素の cDNA クローニング (2)

実施例 3 (6) に記載の pGAT 4、即ち配列表・配列番号 1 記載の DNA を有する pGAT 4 を、制限酵素 EcoRI と NdeI で消化して得られる DNA 断片のうち、アシル基転移酵素の翻訳領域を含む DNA 断片 2 つをまとめて回収し、前述の方法で DIG 標識した。これをプローブとして実施例 3 (4) に記載したリンドウの花弁の cDNA ライブラリーのファージを吸着させたフィルター (Hybond N+, アマーシャム社) を、製造者 (アマーシャム社) が推奨する方法でフィルターに結合した色素及び DIG 標識を除去して再生した後、低濃度ホルムアミドハイブリダイゼーションバッファー (5 × SSC、30%ホルムアミド、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、1% SDS) 中で 42 度で 16 時間ハイブリダイズした。

洗浄液 (5 × SSC、0.1% SDS) 中で 50 度で洗浄し、実施例 3 (4) に記載したように発色させた。数十のクローンが発色したが、発色したクローンのうちで、実施例 3 (4) では発色しな

かったクローンを 12 個得た。これらのクローンの cDNA の塩基配列を先に述べたような方法で、5' 側から決定したところ、11 クローンは pGAT4 の塩基配列と一致したが、1 クローンは一致しなかった。これを pGAT106 とした。

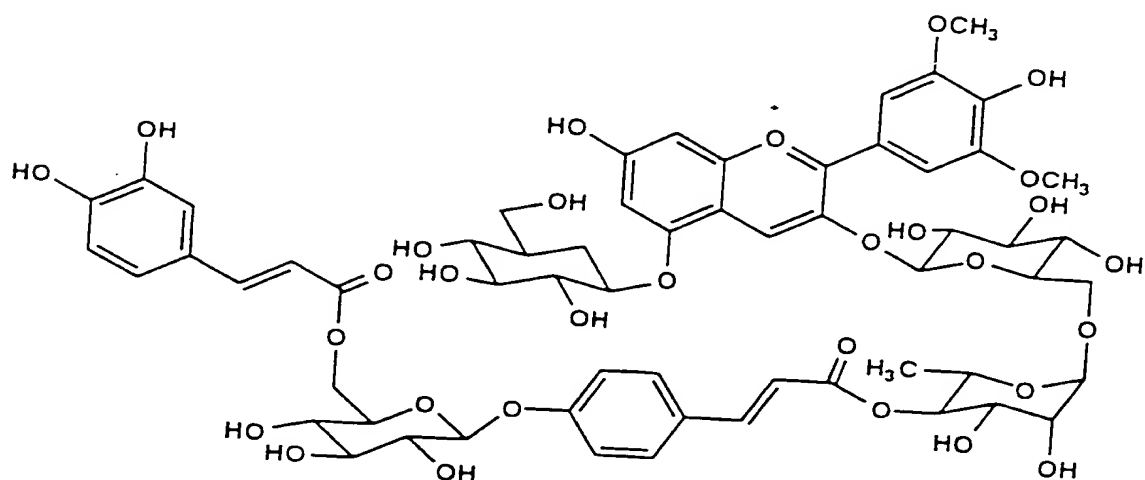
pGAT106 の全塩基配列を先に述べたようにして決定した。pGAT106 に挿入された cDNA は 1622 塩基でありその中に 1440 塩基（終止コドンを含む）からなる ORF が見いだされた。これを配列表・配列番号 2 に示す。配列番号 2 が含む ORF について、pGAT4 がコードするアミノ酸配列と全領域にわたって、相同性を調べた。そのホモロジーは、38% であった。

pGAT106 のコードするアミノ酸配列は、アシル基転移酵素である pGAT4 のコードしている酵素と相同であるため、同様な酵素活性、つまりアントシアニンにアシル基転移を触媒する活性を持っていると推測される。リンドウのアントシアニンは、5 位と 3' 位のグルコースにアシル基が結合しているので、pGAT106 がアントシアニンの 3' 位のグルコースにアシル基を転移する酵素反応を触媒することを示唆する。また、この結果はアシル基転移酵素は、アシル基を転移するアントシアニンの糖の位置は異なっているとしても、アミノ酸配列及びそれをコードしている塩基配列は相同であることを示している。

先に述べたようにアシル基を有するアントシアニンは多数存在し、これら化合物のアシル基の数や位置は多様性に富み、アシル基の転移反応を触媒する酵素も多数あることが推測されるが、それらの酵素のアミノ酸配列は、ここで得られた pGAT4 及び pGAT106 のアミノ酸配列と相同性がみられることは容易に類推でき、これに基づき、他のアシル基転移酵素遺伝子を得ることができる。

#### 実施例 7. ペチュニアのアントシアニン

ペチュニア (*Petunia hybrida*) 品種サフィニアパープル (サントリー (株)) の花色が通常の赤紫から紫に変異した変異株 (VM) のアントシアニンを、その花卉を液体窒素中で粉碎し、50% アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液で抽出した。濾過後、濾液を ODS、ODP の逆相カラムクロマトグラフィーで分離、精製した。そのうちの一つの化合物の構造を FABMS、 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR を用いて、詳細に解析したところ、新規なアントシアニンを見いだした。その構造を以下に示す。



即ち、この構造は 3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-カフェオイル- $\beta$ -D-グルコピラノシル))-クマロイル)- $\alpha$ -L-ラムノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)-5-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジンであり、アシル基が 2 つ結合したアントシアニンであった。

また、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-クマロイル- $\beta$ -D-グルコピラノシル))-クマロイル)- $\alpha$ -L-ラムノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)-5-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジン、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-カフェオイル- $\beta$ -D-グルコピラノシル))-カフェオイル)- $\alpha$ -L-ラムノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)-5-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジン、3-O-(6-O-(4-O-(4-O-(6-O-クマロイル- $\beta$ -D-

- グルコピラノシル)-カフェオイル)- $\alpha$ -L-ラムノシル)- $\beta$ -D-グルコピラノシル)-5-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-マルビジンも検出された。このアントシアニンは、VMの花弁のみならず、フルコンブルー（サカタのタネ（株））、Old Glory Blue(Ball Seeds)などの濃い紫色の花弁にも存在していることがわかった。即ち、アシル基を2つ持つアントシアニンはペチュニアの濃い紫色に寄与していると思われる。

従って、ペチュニア由来のアントシアニンに関するアシル基転移酵素には、アントシアニンの3位のルチノシドにクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素と、モノアシルマルビジンにグルコースを介してクマル酸又はカフェ酸を転移する反応を触媒する酵素の2種類があることを示唆する。

#### 実施例 8. ペチュニア由来のアシル基転移酵素の cDNA クローニング

実施例 3 (6) に記載の pGAT4、即ち配列表・配列番号 1 記載の DNA を有する pGAT4 の cDNA 部分を、前述の方法で DIG 標識し、ペチュニア (Petunia hybrida) 品種オールドグローリーブルーの花弁の cDNA ライブラリー (Nature, 366, 276-279, 1993) をブランクハイブリダイゼーションの手法により、スクリーニングした。ハイブリダイゼーションと洗浄は、実施例 6 と同様の条件で行った。

約 20 万クローンをスクリーニングし、弱くハイブリダイズするクローンを 1 つ得た。このクローンを pPAT5 とした。塩基配列を決定したところ、pPAT5 には複数の DNA が挿入されていた。すなわち、プラスミドのリバースプライマー側に、pGAT4 および pGAT106 のコードする蛋白質の C 末端の配列に似た配列が存在した。そこで、リバースプライマーのもとに、ヌクレオチド



配列：5'-AACAGCTATGACCATG-3'（配列番号：20）を合成し、このオリゴヌクレオチドをR Pプライマーとした。

p P A T 5 の c D N A の完全長を取得するために、R P プライマー、オリゴ2プライマー各100 ng、X h o I で消化したp P A T 5・10 ngを最終体積50  $\mu$  lで、P C R 反応を行った。反応は、95  $^{\circ}$ C 1分、55  $^{\circ}$ C 1分、72  $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとし、20サイクル行った。得られた約600 bpのD N A断片をアガロース電気泳動後、ジーンクリーンで精製した。この断片をS m a Iで酵素消化した後、約400 bpのD N A断片を同様に精製した。このD N A断片を前述のD I Gで標識した。

この標識したD N A断片を用いて、前述のペチュニアの花弁c D N Aライブラリーをブランクハイブリダイゼーションの手法を用いて、スクリーニングした。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、0.2 X S S C、65  $^{\circ}$ C、1時間とした。得られたクローンから回収したプラスミドの塩基配列を決定したところ、p P A T 48が、p P A T 5と同じ配列を含むことがわかった。これを配列表・配列番号3に示す。この配列は、p G A T 4とp G A T 106に対して、アミノ酸配列レベルで、それぞれ20%、16%のホモロジーがあった。

#### 実施例9. シソ由来の粗酵素液の抽出

シソ (Perilla ocimoides)・品種赤チリメンの植物体から、赤い若い葉を採集し、実施例1(2)に記載の方法に従って、粗酵素液の抽出を行った。最終濃度50 mMリン酸カリウム(p H 8.5)、0.48 mMデルフィニジン3, 5-ジグルコシド、0.43 mMカフェオイル-C o Aと20  $\mu$  lの酵素液を含む50  $\mu$  lの混合物を30  $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。反応液に13.8%の酢酸を含む50  $\mu$  lのアセトニトリルを加えて反応を停止した。150

00回転で5分間遠心した後、上清のうちの10 $\mu$ lを以下の条件でHPLCにて解析した。

カラムはYMC-Pack ODS-A (6.0 X 15cm) を用い、0.1%トリフルオロ酢酸、21.6%アセトニトリルの溶媒で、流速1ml/分の条件でサンプルを分離した。検出は、520nmで行った。この条件で未反応のデルフィニジン3,5-ジグルコシドは、3分で、デルフィニジン3,5-ジグルコシドの3位にカフェ酸が転移したものは、4.7分に溶出され、この化合物の吸収極大値は、531nmであった。

基質として、デルフィニジン3-グルコシドを用いた場合も、カフェ酸による修飾が見られた。また、アシル基の供与体として、クマロイル-CoAを用いても、クマール基の転移が見られた。シソは天然にはアントシアニンとしてデルフィニジングルコシドは含まないが、シソのアシル基転移酵素はデルフィニジン3-グルコシドとデルフィニジン3,5-ジグルコシドをアシル基受容体として、クマロイル-CoAをアシル基供与体として利用できることがわかった。

#### 実施例10. シソ由来のアシル基転移酵素の精製

シソアシル基転移酵素の精製は、実施例2(1)に準じて行った。3kgのシソの葉を、液体窒素で凍結させ、凍結したままホモジナイザーで、粉碎した。粉末状になったものに10lの抽出緩衝液(100mMリン酸ナトリウム、pH6.8、10mMアスコルビン酸ナトリウム、5mMジチオスレオトール、10 $\mu$ M p-APMSF、5%(w/v)ポリクラールSB-100)中で、再び、ホモジナイザーで磨砕した。これを4層に重ねたガーゼで濾過後、遠心分離(8000回転、4度、30分)を行った。上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて、溶解後、同じ条件で

遠心分離を行う。上清に 70 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、溶解後、同じ条件で遠心分離を行う。沈殿を最小量の脱塩緩衝液（ビストリス塩酸、pH 6.3、1 mM ジチオスレイトール、10  $\mu$ M p-APMSF、10 % グリセロール）に溶解した後、同じ緩衝液で平衡化したセファデックス G-25 メディウム（ファルマシア社、9.5 X 45 cm）で脱塩した。

脱塩したサンプルを Q-セファロースファーストフロー 26 / 10 を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った。脱塩緩衝液をもとにした塩化ナトリウムの 0 から 0.5 M の直線濃度勾配を 8 ml / 分の流速で 1 時間かけて行った。活性画分は、食塩濃度 0.15 から 0.3 M 付近で溶出された。この活性画分を、脱塩緩衝液で平衡化した HiTrapBlue (5 ml) を 4 本直列に接続したカラムに吸着させた。同じ緩衝液でカラムを良く洗浄した後、脱塩緩衝液をもとにした 0 から 1 M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配（2 時間、流速 5 ml / 分）で溶出した。活性画分は塩化ナトリウム濃度 0.8 から 0.9 M で溶出した。この画分を次にヒドロキシアパタイトカラム（セラミックタイプ II 40 mm ; バイオラド社）でクロマトグラフィーを行った。緩衝液 A（50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.8、1 mM ジチオスレイトール、10  $\mu$ M p-APMSF、10 % グリセロール）で、サンプルをかけたカラムをよく洗浄し、緩衝液 A から緩衝液 B（400 mM リン酸ナトリウム、pH 6.8、1 mM ジチオスレイトール、10  $\mu$ M p-APMSF、10 % グリセロール）への直線濃度勾配（1 時間、流速 2.5 ml / 分）で酵素を溶出したところ、約 0.2 M リン酸ナトリウムで溶出した。この活性画分を用いて酵素の生化学的性質を調べた。

粗酵素標品を用いた場合と同様に、アシル基の受容体としては、シアニジン 3-グルコシド、シアニジン 3, 5-ジグルコシド、デ

ルフィニジン 3-グルコシド、デルフィニジン 3, 5-ジグルコシドのいずれを用いることができた。アシル基の供与体としては、クマロイル-CoAでも、カフェオイル-CoAでも用いることができた。また、SDS ポリアクリルアミド電気泳動から、分子量は約 50000 であった。等電点は、Mono-Pカラム（ファルマシア社）を用いて、5.3 と決定した。

#### 実施例 11. シソ由来のアシル基転移酵素の cDNA クローニング

実施例 3、実施例 6 及び実施例 8 でクローニングした pGAT4、pGAT106、pPAT48 の構造を比較すると、アミノ酸配列；Asp-Phe-Gly-Trp-Gly-Lys（配列番号：21）が保存されていることがわかった。従って、この構造は、アシル基転移酵素において保存されていることが予想される。そこで、この配列をもとに、ヌクレオチド配列；5'-GA(TC)TT(TC)GGITGGGGIAA-3'（配列番号：22）を合成し、このオリゴヌクレオチドを ATC プライマーとした。

シソの若い葉から RNA を実施例 3 に記載の方法で抽出し、同じく、ZAP-cDNA 合成キット（ストラタジーン社製）を用い、cDNA ライブラリーを作製した。この際にできた 2 本鎖の cDNA 約 50 ng を鋳型にして、ATC プライマーとオリゴ 2 プライマーを各 100 ng 用い、最終体積 50  $\mu$ l にて、PCR キット（宝酒造（株）製）を用いて、PCR 反応を行った。反応は、95  $^{\circ}$ C 1 分、50  $^{\circ}$ C 1 分、72  $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとし、25 サイクル行った。得られた約 400 bp の DNA 断片を回収し、TA クローニングキット（Invitrogen 社）を用いて、ベクターにクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定したところ、pSAT104 としたクローンが pGAT4 に対して高いホモロジーを示した。

10 ng の pSAT104 を鋳型にして、ATC プライマーとオ

オリゴ2プライマーを各100ng用いて、最終体積50 $\mu$ lにて、PCRキット（宝酒造（株）製）を用いて、PCR反応を行った。反応は、95 $^{\circ}$ C 1分、50 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとし、15サイクル行った。この反応物の1 $\mu$ lを用い、ATCプライマーとオリゴ2プライマーを各100ng用いて、最終体積50 $\mu$ lにて、同様にPCRキットを用いて、PCR反応を行った。

ただし、この際デオキシヌクレオチド溶液として、DIG標識ヌクレオチド溶液（ベーリンガー社製）を4 $\mu$ l用いた。反応終了後、5 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウムと100 $\mu$ lのエタノールを加え、エタノール沈殿を行い、以後の実験に用いた。

このpSAT104由来の標識DNAを用いて、シソの葉のcDNAライブラリーをプラークハイブリダイゼーションの手法でスクリーニングした。洗浄は、1XSSC、65 $^{\circ}$ Cで1時間行った。ハイブリダイズしたクローンの塩基配列を決定したところ、pSAT206、pSAT207、pSAT208、pSAT209、pSAT210などのクローンがpSAT104の塩基配列を含んでいることがわかった。これらのクローンの5'側の塩基配列をpGAT4と比較したところ、どのクローンもpGAT4よりアミノ末端が短く開始コドンも見られなかった。また、pSAT206とpSAT208、pSAT209とpSAT210は、5'側の塩基配列は同一であった。pSAT207は、pSAT206より6残基、pSAT209はpSAT206より5残基短かった。

ベクターpBluescript SK 上で、これらのcDNAは、ベクターのLacZ遺伝子と融合できる形となっている。上のクローンの内、pSAT206、pSAT208、pSAT207は、LacZのコードしている大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼと融合蛋白として発現できる形になっているが、pSAT209とpSAT210は、

フレームがずれているので融合蛋白質とはならない。p S A T 2 0 6、p S A T 2 0 7、p S A T 2 0 9、p S A T 2 1 0を大腸菌で発現させ、デルフィニジン 3, 5-ジグルコシドとカフェオイル-C o Aを用いて、3位のグルコースへのアシル基転移酵素活性を測定した。発現の誘導などの方法は、実施例 4 に記載の方法に従った。

p S A T 2 0 9、p S A T 2 1 0を含む大腸菌は、アシル基転移酵素活性を全く示さなかったが、p S A T 2 0 6を含む大腸菌は、デルフィニジン 3, 5-ジグルコシドの 48%をアシル化する酵素活性を示し、p S A T 2 0 7を含む大腸菌は同じく 24%をアシル化する酵素活性を示した。このことから、得られた p S A T 2 0 6、p S A T 2 0 7などは、シソのアントシアニンの 3位のグルコースにアシル基を転移する酵素活性を持つ遺伝子をクローニングできたことが証明できた。

これらのクローンの内、p S A T 2 0 8の c D N A由来の塩基配列を決定した。これを配列表・配列番号 4 に示す。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、p G A T 4、p G A T 1 0 6、p P A T 4 8 に対して、37%、29%、15%のホモロジーを示した。先に述べたようにこの配列は、完全長の c D N Aではないが、L a c Zとの融合遺伝子などとして、適当な開始コドンを与えることで、活性のある酵素を発現できる。

また、このように本発明で明らかになったアシル基転移酵素のアミノ酸配列を比較することにより、保存されている領域が明らかになった。この領域のアミノ酸配列をもとにすれば、アントシアニンの他の位置の糖を修飾するアシル基転移酵素をクローニングすることができる。

実施例 1 2 . サイネリア由来のアシル基転移酵素の c D N A クロ

### ーニング

サイネリア (Senecio cruentus) 品種ジュピターブルー (サカタノタネ) の花卉から実施例 3 に記載の方法で RNA を抽出し、さらに Poly A + RNA を精製した。ZAP-cDNA 合成キット (ストラタジーン社製) を用いて、cDNA ライブラリーを作製した。

この際にできた 2 本鎖の cDNA 約 50 ng を鋳型にして、ATC プライマーとオリゴ 2 プライマーを各 100 ng 用い、最終体積 50  $\mu$ l にて、宝の PCR キットを用いて、PCR 反応を行った。反応は、95  $^{\circ}$ C 1 分、50  $^{\circ}$ C 1 分、72  $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとし、25 サイクル行った。得られた約 400 bp の DNA 断片を回収し、TA クローニングキット (Invitrogen 社) を用いて、ベクターにクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定したところ、pJAT4 としたクローンが pGAT4 に対して高いホモロジーを示した。

次にサイネリアの花卉 cDNA ライブラリーを pJAT4 でスクリーニングした。いくつかのクローンが得られたが、それらの cDNA の 5' 末端側の塩基配列から類推したアミノ酸配列は、pGAT4 のコードしている蛋白質の配列と比較してみると、サイネリアのクローンの cDNA はいずれも完全長ではなかった。そのうち、pCAT8 としたクローンの cDNA の前塩基配列を決定した。これを配列表・配列番号 5 に示す。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、pGAT4、pGAT106、pPAT48、pSAT208 に対してそれぞれ 28%、35%、16%、37% のホモロジーを示した。

### 実施例 13. リンドウ由来のアシル基転移酵素遺伝子を含むバイナリベクターの作製

リンドウのアシル基転移酵素遺伝子 p G A T 4 を KpnI で完全に消化した後、XbaI で部分消化して得られる約 1.6 kb の D N A 断片を回収した。この D N A 断片を p U C 1 9 の KpnI と XbaI の制限酵素認識部位を用いてサブクローニングし、プラスミド p U C G A T 4 を得た。p U C G A T 4 を BglII で完全消化したのち、SacI で部分消化し、約 0.95 kb の D N A 断片を回収した。この D N A 断片と、p U C G A T 4 を XbaI と BglII で消化して得られる約 0.75 kb の D N A 断片と、プラスミド p 2 1 1 3 G (たとえば、Aida et al., Acta Horticulture, 392, 219-225, 1995 に記載されている) を XbaI と SacI で消化して得られる D N A 断片をライゲーションして得られるプラスミドを p B E G A 4 とした。このプラスミドは、バイナリーベクターであり、リンドウのアシル基転移酵素 c D N A は、植物細胞内においては、エンハンサーを有するカリフラワーモザイクウィルス 3 5 S プロモーターとノパリン合成酵素ターミネーターの制御下にある。また、リンドウアシル基転移酵素 c D N A の 5' 末端に、 $\Omega$  配列と呼ばれる翻訳のエンハンサーを含んでいる。この際、プロモーターやターミネーターは本記載に限定されるものではなく、構成的なプロモーターであっても、また、カルコン合成酵素遺伝子のプロモーター等のように花卉で特異的に働くものであっても良い。

#### 実施例 14. リンドウ由来のアシル基転移酵素遺伝子の植物への導入

p B E G A 4 を Plant Molecular Biology Manual (Kluwer Academic Publishers) に記載されている方法で、Agrobacterium tumefaciens の A g 1 0 株 (Lazo et al., Bio/Technology, 9, 963-967, 1991) に導入した。一方、バラ品種ラバンデの茎頂を、M S 培地に B A (6-ベンジルアミノプリン) 2.25 mg/l、G A 3 (シ



ベレリン酸) 3. 46 mg / l、蔗糖 30 g / l、ジェランガム 2 g / l を加えた固体培地で培養して Embryogenic Callus (EC) を得た。前述の Ag 10 株を LB 培地で一晩振とう培養したものを 20  $\mu$ g / ml のアセトシロンゴンを含む MS 液体培地に懸濁し、約  $5 \times 10^8$  cells / ml の濃度に調整した。この菌液中に EC を 5 分間浸漬した後、滅菌濾紙で余分な液を十分に拭き取り、BA 2. 25 mg / l、GA 3 0. 35 mg / l、蔗糖 30 g / l、ジェランガム 2 g / l を加えた MS 培地に移植し培養することにより、形質転換体を得ることができる。得られたカナマイシン抵抗性カルスから、トリゾール (ライフテックオリエンタル社) を用いて RNA を得た。この RNA を鋳型にして、pGAT4 の塩基配列をもとにして合成したヌクレオチド GAT-1 ; 5'-TGGCAACTGTCTTGC GTCATG-3' (配列番号 : 23) と、ヌクレオチド GAT-2 ; 5'-CCATG TCAGGTGTGAGTTCAAC-3' (配列番号 : 24) をプライマーとして用いて、アクセス RT-PCR システム (プロメガ社) を使用して、RT-PCR 反応を行った。また、同じ RNA を鋳型として、バイナリーベクター上の nptII の塩基配列にもとづいて合成したオリゴヌクレオチド Kan-1 ; 5'-ATCGTTTCGCATGATTGAAC-3' (配列番号 : 25) と、ヌクレオチド Kan-2 ; 5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAA-3' (配列番号 : 26) とを用いて、同様に RT-PCR 反応を行った。反応は、94 °C 30 秒、60 °C 1 分、68 °C 2 分を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。形質転換体のカルスからは、pGAT4 に由来するバンド及び nptII に由来するバンドが観察されたが、非形質転換体のカルスからはこれらに対応するバンドは検出できなかった。この結果は、リンドウのアシル基転移酵素遺伝子をバラに導入できたことを示す。

また、ここに述べたバイナリーベクターの構築や植物への形質転

換は、p G A T 4 に含まれるリンドウのアシル基転移酵素遺伝子に限られるものではなく、他のアシル基転移酵素も、植物への導入と植物での遺伝子発現が可能である。また、植物の種として、ここでは、バラをあげたが、他の多くの植物で（たとえば、カーネーション、キク、タバコ、ペチュニア、ガーベラ、ペチュニアなど）形質転換の方法が報告されているので、公知の方法を用いれば、多くの植物種にアシル基転移酵素の導入が可能である。

#### 実施例 15. 完全長のシソ由来のアシル基転移酵素の c D N A の合成

シソアシル基転移酵素遺伝子 c D N A、p S A T 2 0 8 は、先に述べたように活性のある酵素はコードしているが、完全長ではなかった。そこで、リンドウのアシル基転移酵素遺伝子 p G A T 4 の塩基配列をもとに開始コドンを含む完全長 c D N A を合成した。すなわち、以下に示す D N A を合成した。また、そのコードするアミノ酸配列を併記した。最初の下線はクローニングのための BamHI 認識配列で、次の下線は p S A T 2 0 8 に含まれる配列である。また、BamHI の認識配列の後に植物で翻訳開始コドンの直前によく見られる配列 AACA を挿入してある。

5' GGGATCCAACA ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG GCC GTG ATC GAA ACG TGT AGA 3'

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Ala Val Ile Glu Thr Cys Arg

（配列番号：27）

このプライマーと - 2 0 プライマー；5' -GTAAAACGACGGCCAT -3'（配列番号：28）とをそれぞれ 1 0 0 n g、p S A T 2 0 8 を 1 0 n g を含む P C R 反応を最終体積 5 0  $\mu$  l で行った。反応は、9 5  $^{\circ}$ C 1 分、5 5  $^{\circ}$ C 1 分、7 2  $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとし、1 5 サイクル行った。反応後、反応液から D N A 断片を G e n e c l e a n（Bio101 社）を用いて製造者の推奨する方法で、回収した。回収した D N A

をBamHI とEcoRI で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、約200bpのDNA断片を回収した。このDNA断片を、pSAT208をEcoRI で消化して得られる約3.3kbのDNA断片とライゲーションし、得られたプラスミドをpSATF208とした。このプラスミドの塩基配列をcDNAの5'末端から決定し、塩基配列を確認した。

実施例16. シソ由来のアシル基転移酵素遺伝子の酵母における発現

実施例5で述べた方法に従って、pSATF208を酵母で発現させ、酵素活性の測定を行った。すなわち、pYE22mをBamHI とSalIで消化して得られる約8kbのDNA断片と、pSATF208をBamHI とSalIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片をライゲーションし得られたプラスミドをpYSAT208とした。

pYSAT208で酵母G1315を形質転換し、得られた形質転換体のアシル基転移酵素活性を測定した。その結果、pYSAT208を導入した酵母では、24nmolのデルフィニジン3,5-ジグルコシドと21.5nmolのカフェオイル-COAから10nmolのデルフィニジン3-カフェオイルグルコシド5-グルコシドの生成が認められた。従って、pSATF208に含まれる合成した完全長cDNAは、アシル基転移酵素活性をコードすることが確認できた。

実施例17. シソ由来のアシル基転移酵素遺伝子を含むバイナリーベクターの作製

プラスミドpE12ΩGUSは、プラスミドp2113G (Aida et al., Acta Horticulture, 392, 219-225, 1995) 上のGUS遺伝子の発現ユニットがプラスミドpUC19のHindIII とEcoRI 認

識部位に挿入されているプラスミドである。p E 1 2 Ω G U S を Sa c I で消化し、DNA ブランディングキット（宝酒造（株））で、平滑末端化した後、Xho I リンカー（東洋紡（株））とライゲーションした。得られたXho I リンカーの挿入されたプラスミドを p E 1 2 Ω G U S x とした。このプラスミドをHindIII とEcoRI で消化して得られる約2.8 kbのDNA断片を、HindIII とEcoRI で消化した p B i n 1 9 とライゲーションし、得られたプラスミドを p B E G U S x とした。p B E G U S x を BamHI とXhoIで消化して得られる1.1 kbのDNA断片と、p S A T F 2 0 8 を BamHI とXhoIで消化して得られるDNA断片をライゲーションして得られるプラスミドを p B E S A 2 0 8 とした。このプラスミド上で、シソのアシル基転移遺伝子は、エンハンサーを含むカリフラワーモザイクウィルスのプロモーターとノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターの制御下にある。

実施例18. シソ由来のアシル基転移酵素遺伝子の植物への導入

p B E S A 2 0 8 を Plant Molecular Biology Manual （Kluwer Academic Publishers）に記載されている方法で、Agrobacterium tumefaciens の A g 1 0 株（Lazo et al., Bio/Technology, 9, 963-967, 1991）に導入した。A g 1 0 株の形質転換体を用いて、Plant Molecular Biology Manual （Kluwer Academic Publishers）に記載されている方法を用いて、ペチュニア フルコンレッド（サカタのタネ）、バカラレッド（サカタのタネ）、タイタンレッド（サカタのタネ）に形質転換した。なお、これらのペチュニアの花弁にはシアニジン3-β-D-グルコシドが主なアントシアニンとして含まれている。

また、先に述べた方法でバラ品種ラバンデにも形質転換を行った

### 実施例19. 完全長のサイネリア由来のアシル基転移酵素の c D N A の合成

サイネリア由来のアシル基転移酵素遺伝子 c D N A、p C A T 8 は、先に述べたように完全長ではなかった。そこで、リンドウのアシル基転移酵素遺伝子 p G A T 4 の塩基配列をもとに開始コドンを含む完全長 c D N A を合成した。すなわち、以下に示す D N A を合成した。そのコードするアミノ酸配列を併記した。最初の下線はクローニングのための BamHI 認識配列で、次の下線は p C A T 8 に含まれる配列である。

5'-GGGATCCAACA ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAC ATT CTC GAA C-3'

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Asn Ile Leu Glu

(配列番号：29)

このプライマーと - 2 0 プライマーをそれぞれ 1 0 0 n g、p C A T 8 を 1 0 n g を含む P C R 反応を最終体積 5 0  $\mu$  l で行った。反応は、9 5  $^{\circ}$ C 1 分、5 5  $^{\circ}$ C 1 分、7 2  $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとし、1 5 サイクル行った。反応後、反応液から D N A 断片を Geneclean (Bio101社) を用いて製造者の推奨する方法で、回収した。回収した D N A を BamHI と MvaI で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、約 2 0 0 b p の D N A 断片を回収した。この D N A 断片を、p C A T 8 を MvaI と XhoI で消化して得られる約 1 . 3 k b の D N A 断片と、BamHI と XhoI で消化した pBluescript IISK とをライゲーションし、得られたプラスミドを p C A T F 8 とした。このプラスミドの塩基配列を c D N A の 5 ' 末端から決定し、塩基配列を確認した。

### 実施例20. ラベンダー由来のアシル基転移酵素をコードする c D N A のクローニング

シソ科のラベンダー (Lavandula angustifolia) の花卉由来の

cDNAライブラリーを、実施例3で述べた方法で作製し、同じく実施例3に述べた方法で、プラークハイブリダイゼーションの方法を用いて、約30万クローンをスクリーニングした。すなわち、プローブには、合成ヌクレオチドのRIプライマー；5'-CTCGGAGGAATTCGGCACGAC-3'（配列番号：30）とオリゴ2をそれぞれ100 $\mu$ g、pSAT208を10ng用い、ヌクレオチドとしてDIG標識ヌクレオチドを使用し、最終体積50 $\mu$ lでPCRを行って得られたものを使用した。反応は、95 $^{\circ}$ C 1分、50 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとし、25サイクル行った。

標識したcDNA断片をハイブリダイゼーション液中に加え、さらに16時間、37 $^{\circ}$ Cに保持し、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄液（5 $\times$ SSC、1%SDS）でフィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼで標識されたDIG特異的抗体による酵素免疫測定法（ベーリンガー・マンハイム社）による5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって陽性クローンを検出した。なお、検出方法は製造社による使用説明書に従った。

この結果1個の陽性クローンが得られ、このcDNAをストラタジーン社の推奨する方法で $\lambda$ ファージをベクターとする形からプラスミドpBluescript II SK- をベクターとする形に回収した。得られたクローンからプラスミドを抽出し、これをpLAT1とした。先に述べたように、ABI373 DNA シークエンサー（パーキンエルマー社）を用い、同社の推奨する蛍光色素によるダイデオキシシークエンス法で、pLAT1のcDNAの5'末端付近の塩基配列を決定した。得られた塩基配列から導かれるアミノ酸配列は、シソヤリンドウのアシル基転移酵素のアミノ酸配列と高い相同性を示し、pLAT1がラベンダーのアシル基転移酵素をコードすることが推察

された。しかし、pLAT1のコードするアミノ酸配列はシソやリンドウのアシル基転移酵素のアミノ酸配列と比べて短く、アシル基転移酵素の全長をコードするには満たないと考えられた。そこでDIGで標識したpLAT1のcDNAフラグメントをプローブとし、ラベンダーの花弁由来のcDNAライブラリーを上 に述べたのと同様の条件でスクリーニングした。プローブは、pLAT1プラスミド約1 ngを鋳型とし、下記に示すRIプライマーとオリゴ2各500 ng、dNTP標識混合液（ベリンガー）8  $\mu$  lを含む最終体積50  $\mu$  lのPCR反応により標識した。PCR反応は95℃1分、42℃2分、72℃3分からなるサイクルを25サイクル行い、さらに伸長反応を完全にするため72℃に7分保持した。プライクハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド濃度は50%、フィルターの洗浄は2 $\times$ SSC、1%SDSで行った以外は上に述べたのと同様であった。得られた陽性クローンの5'末端付近の塩基配列を前述同様にして決定し、pLAT1よりも11 bp長いクローン、pLAT21を得た。これを配列表、配列番号6に示す。しかしpLAT21も開始メチオニンコドンを含まず、アシル基転移酵素の全長をコードするには満たないクローンであった。

#### 実施例21. 完全長のラベンダー由来のアシル基転移酵素のcDNA Aの合成

ラベンダーのアシル基転移酵素をコードすると考えられるcDNA A、pLAT21は開始メチオニンコドンを含まないため、酵母での発現のためにはcDNAの5'末端に開始メチオニンコドン进行付加する必要がある。そこで、下記の様なプライマーを用いて、PCRを行い、開始メチオニンコドン进行pLAT21のcDNAの5'末端に付加したフラグメントを合成した。プライマーLAT-A T

G は p L A T 2 1 の 5' 末端 2 0 塩基の配列に加えて、開始メチオニンコドンと、その上流に隣接して存在するといわれている植物での遺伝子発現のための保存配列 AACA、および酵母発現ベクターへの連結に必要な制限酵素 BamHI 認識部位 GGATCC を 5' 上流から 3' 方向に含むようにデザインされている。LAT-ATG プライマー（配列番号：31）

5' AGTCGGATCCAACA ATG ACC ACC CTC CTC GAA TCC 3'

Thr Thr Leu Leu Glu Ser

P C R 反応は p L A T 2 1 プラスミド約 1 0 0 n g を鋳型とし、L A T - A T G プライマーとオリゴ 2 各 5 0 0 n g、を含む最終体積 5 0  $\mu$  l で P C R 反応を行った。反応は 9 5  $^{\circ}$ C 1 分、4 2  $^{\circ}$ C 2 分、7 2  $^{\circ}$ C 3 分からなるサイクルを 1 0 サイクル行い、さらに伸長反応を完全にするため 7 2  $^{\circ}$ C に 7 分保持した。得られた D N A 断片を BamHI と EcoRI で切断し、約 5 5 0 b p の D N A 断片を回収した。この D N A 断片をプラスミドベクター pBluescript II SK- の BamHI と EcoRI サイトにサブクローニングし、p L A T P C R 1 1 とした。前述同様にして p L A T P C R 1 1 の塩基配列を決定し、P C R によって増幅されたこの D N A 断片が、p L A T 2 1 c D N A の 5' 末端から EcoRI サイトまでと同一の配列をもち、L A T - A T G プライマー中の開始メチオニンコドンと植物での遺伝子発現のための保存配列、および酵母発現ベクターへの連結に必要な制限酵素 BamHI 認識部位を含むものであることを確認した。

さらに、p L A T 2 1 の c D N A 部分の全塩基配列を p G A T 4 の c D N A の塩基配列を決めたのと同様な方法で決定した。この c D N A がコードしていると予想されるアミノ酸配列は、p S A T 2 0 8、p G A T 4、p C A T 8、p G A T 1 0 6、p P A T 4 8 に対して、それぞれ、6 9 %、3 8 %、3 7 %、3 7 %、1 9 % のホ



モロジーを示した。

実施例22. ラベンダー由来のアシル基転移酵素遺伝子の酵母における発現

p L A T P C R 1 1 から BamHI と EcoRI で切断される約 5 5 0 b p の D N A 断片と、p L A T 2 1 から EcoRI と XhoI で切断して得られる約 1 k b の D N A 断片と、酵母発現ベクター p Y E 2 2 m を BamHI と SalI で切断して得られる約 8 k b の D N A 断片をライゲーションして得られるプラスミドを p Y E L A T 2 1 とした。先に述べたように、酵母 G 1 3 1 5 をこのプラスミドで形質転換し、アシル基転移酵素活性を測定した。

その結果、p Y E L A T 2 1 を導入した酵母では、2 4 n m o l のデルフィニジン 3, 5 - ジグルコシドと 2 1. 5 n m o l のカフェオイル - C o A から 1 9. 9 n m o l のデルフィニジン 3 - カフェオイルグルコシド 5 - グルコシドの生成が認められた。従って、p Y E L A T 2 1 に含まれる合成した完全長 c D N A は、アシル基転移酵素活性をコードすることが確認できた。

実施例23. ラベンダーアシル基転移酵素遺伝子を含むバイナリーベクターの作製

p L A T P C R 1 1 から BamHI と EcoRI で切断される約 5 5 0 b p の D N A 断片と、p L A T 2 1 から EcoRI と XhoI で切断して得られる約 1 k b の D N A 断片と、p B E G U S x を BamHI と XhoI で消化して得られる約 1 1 k b の D N A 断片をライゲーションして得られるプラスミドを p B E L A 1 1 とした。これを先に述べた方法で Agrobacterium tumefaciens の A g 1 0 株に形質転換し、ペチュニアとバラの形質転換に供した。

実施例24. アシル基転移酵素に対する抗体の作製

ある酵素に対して、アミノ酸配列が似ている酵素の遺伝子をとる

方法の一つとして、ある酵素に対する抗体で、発現型の c D N A ライブラリーをスクリーニングする方法が上げられる。ここでは、以下のようにして、リンドウの p G A T 4 のコードするアシル基転移酵素に対する抗体を作製した。同様にして、他のアシル基転移酵素の抗体を作製することが可能である。

まず、Bulk and RediPack GST Purification Modules (pharmacia Biotech) を用いて大腸菌で G A T 4 タンパク質を大量発現させ、そこから精製を行った。

#### (1) 発現プラスミドの構築

大腸菌でのアシル基転移酵素遺伝子の発現には p G E X - 4 T - 1 を用いた。この p G E X - 4 T - 1 を用いてグルタチオン S - トランスフェラーゼとの融合タンパク質をつくり、その後グルタチオン S - トランスフェラーゼのアフィニティカラムを用いることで効率的な精製が行える。

p G E X - 4 T - 1 を SmaI と XhoI で消化した後、D N A ブランディングキット (宝酒造 (株)) を用いて平滑末端化した。得られた約 4 . 9 k b の D N A 断片をアルカリホスファターゼ B A P C 7 5 (宝酒造 (株)) を用いて脱リン酸化した。p G A T 4 を当該ベクター内に存在する制限酵素部位 SmaI と KpnI で消化して得られる約 1 . 6 k b の D N A 断片を前述と同じように平滑末端化し、前述の p G E X - 4 T - 1 を SmaI と XhoI で消化した後平滑末端化した部位に組み換えて、p G E X G A T 4 を構築した。EcoRI と BglII で消化して p G A T 4 上の c D N A とグルタチオン S - トランスフェラーゼの向きが同方向であることを確認した。

#### (2) アシル基転移酵素の大腸菌における発現

p G E X G A T 4 で大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換した。大腸菌の形質転換法は Hanahan の方法に従った (J. Mol. Biol., 166, 557-, 1

983)。形質転換された大腸菌をアンピシリン ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及び 2 % グルコースを含む  $2 \times \text{YT}$  培地 (トリプトン 16 g、イーストエキストラクト 10 g、塩化ナトリウム 5 g を 1 リットルの蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調製する) 50 ml に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。この培養液 40 ml を 400 ml のアンピシリン ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及び 2 % グルコースを含む  $2 \times \text{YT}$  培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 3 時間培養後、0.1 M の IPTG を  $440 \mu\text{l}$  (終濃度 10 mM) 添加し、さらに 5 時間培養した。集菌後、 $10 \mu\text{M}$  の APMSF を含む  $1 \times \text{PBS}$  (塩化ナトリウム 8.2 g、塩化カリウム 2.0 g、リン酸水素二ナトリウム 1.43 g、リン酸二水素カリウム 2.45 g を 1 リットルの蒸留水に溶かした) 100 ml に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎した後、20 % トリトン X-100 を 5 ml (終濃度 1 %) 添加した。氷中で冷却しながら 30 分振蕩した後、 $12000 \text{ rpm}$  で 10 分間遠心し、得られた沈殿を 12 ml の 6 M の Urea に懸濁し等量の  $2 \times \text{SDS}$  サンプルバッファーを加えて  $90^\circ\text{C}$ 、5 分間処理し試料として用いた。

この試料 0.8 ml をディスクゲル電気泳動 (分離ゲル 7.5 % アクリルアミド、濃縮ゲル 5 % アクリルアミド; ATTO (株) BIO PHORESIS I III) にて分離し、0.8 ml ずつ分取した。各画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (分離ゲル 10 % アクリルアミド、濃縮ゲル 4.5 % アクリルアミド) で分析した結果、pGAT4 のコードするアシル基転移酵素とグルタチオン S-トランスフェラーゼの融合蛋白質の大きさと一致する分子量約 75000 の蛋白質が単一の蛋白質として存在する画分があった。

この画分 (3.2 ml) を Centricon 10 (Amicon 社) で濃縮し約  $0.3 \mu\text{g}$  の融合蛋白質を得た。この試料を用いて、BALB/C

マウスを用いて常法に従い、抗体を作製した。この抗体を用いて、アシル基転移酵素のホモログを取得することができる。

#### 産業上の利用可能性

以上のように、本発明においてはリンドウ由来の芳香族アシル基転移酵素の精製、当該酵素の c D N A のクローニング及び当該 c D N A の塩基配列の決定を行った。また、大腸菌と酵母での活性発現を行うことにより、分離した c D N A が芳香族アシル基転移酵素をコードするものであることを確認した。

従って、本発明に係る c D N A を適当な植物発現ベクターに接続し、植物に導入することにより、アシル化反応を植物の花色調節に利用することが可能となった。

また、本酵素活性を利用することにより、植物の中であるいは試験管内でアントシアンの構造を改変し、より安定なアントシアンを提供することができる。

## 〔配列表〕

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 7 0 3

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 ( MOLECULE TYPE ) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica* )

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

### 直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT4

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TCATT ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAG GTT CTT GAA AAA TGC CAA 47

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys Gln

-1      1                          5                                  10

GTT ACA CCA CCA TCT GAC ACA ACA GAT GTC GAG TTA TCG CTA CCG GTA 95

Val Thr Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu Pro Val

15                      20                      25

ACA TTC TTC GAT ATC CCC TGG TTG CAC TTG AAT AAG ATG CAG TCC CTT 143

Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Asn Lys Met Gln Ser Leu

30                      35                      40                      45

CTG TTT TAC GAC TTT CCG TAC CCA AGA ACA CAT TTC TTG GAC ACT GTT	191
Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Arg Thr His Phe Leu Asp Thr Val	
50 55 60	
ATC CCT AAT CTT AAG GCC TCT TTG TCT CTC ACT CTA AAA CAC TAC GTT	239
Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr Leu Lys His Tyr Val	
65 70 75	
CCG CTT AGC GGA AAT TTG TTG ATG CCG ATC AAA TCG GGC GAA ATG CCG	287
Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile Lys Ser Gly Glu Met Pro	
80 85 90	
AAG TTT CAG TAC TCC CGT GAT GAG GGC GAC TCG ATA ACT TTG ATC GTT	335
Lys Phe Gln Tyr Ser Arg Asp Glu Gly Asp Ser Ile Thr Leu Ile Val	
95 100 105	
GCG GAG TCT GAC CAG GAT TTT GAC TAC CTT AAA GGT CAT CAA CTG GTA	383
Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val	
110 115 120 125	
GAT TCC AAT GAT TTG CAT GGC CTT TTT TAT GTT ATG CCA CGG GTT ATA	431
Asp Ser Asn Asp Leu His Gly Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile	
130 135 140	
AGG ACC ATG CAA GAC TAT AAA GTG ATC CCG CTC GTA GCC GTG CAA GTA	479
Arg Thr Met Gln Asp Tyr Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val	
145 150 155	
ACC GTT TTT CCT AAC CGT GGC ATA GCC GTG GCT CTG ACG GCA CAT CAT	527
Thr Val Phe Pro Asn Arg Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His	
160 165 170	
TCA ATT GCA GAT GCT AAA AGT TTT GTA ATG TTC ATC AAT GCT TGG GCC	575
Ser Ile Ala Asp Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Ile Asn Ala Trp Ala	
175 180 185	

5 5

GGC AAC TGT CTT GCG TCA TGC GTT GCA AAA GCA ACA CAT AAA GAG TTA 1055  
 Gly Asn Cys Leu Ala Ser Cys Val Ala Lys Ala Thr His Lys Glu Leu  
 335 340 345  
 GTT GGG GAT AAA GGG CTT CTT GTT GCA GTT GCA GCT ATT GGA GAA GCC 1103  
 Val Gly Asp Lys Gly Leu Leu Val Ala Val Ala Ala Ile Gly Glu Ala  
 350 355 360 365  
 ATT GAA AAG AGG TTG CAC AAC GAA AAA GGC GTT CTT GCA GAT GCA AAA 1151  
 Ile Glu Lys Arg Leu His Asn Glu Lys Gly Val Leu Ala Asp Ala Lys  
 370 375 380  
 ACT TGG TTA TCG GAA TCT AAT GGA ATC CCT TCA AAA AGA TTT CTC GGG 1199  
 Thr Trp Leu Ser Glu Ser Asn Gly Ile Pro Ser Lys Arg Phe Leu Gly  
 385 390 395  
 ATT ACC GGA TCG CCT AAG TTC GAT TCG TAT GGT GTA GAT TTT GGA TGG 1247  
 Ile Thr Gly Ser Pro Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Val Asp Phe Gly Trp  
 400 405 410  
 GGA AAG CCT GCA AAA TTT GAC ATT ACC TCT GTT GAT TAT GCA GAA TTG 1295  
 Gly Lys Pro Ala Lys Phe Asp Ile Thr Ser Val Asp Tyr Ala Glu Leu  
 415 420 425  
 ATT TAT GTG ATT CAG TCC AGG GAT TTT GAA AAA GGT GTG GAG ATT GGA 1343  
 Ile Tyr Val Ile Gln Ser Arg Asp Phe Glu Lys Gly Val Glu Ile Gly  
 430 435 440 445  
 GTA TCA TTG CCT AAG ATT CAT ATG GAT GCA TTT GCA AAA ATC TTT GAA 1391  
 Val Ser Leu Pro Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu  
 450 455 460  
 GAA GGC TTT TGC TCT TTG TCA TAGTCTCTTT AATAGAACCA TATTTGCTGC 1442  
 Glu Gly Phe Cys Ser Leu Ser  
 465 468



AATAAAGTAC CAAGTCCTTT AGTAACACTA CACCAAACCC TACTTTCGAG GCGGGAACAC 1502  
 CACAACGAGG TTCAATCACT AGAAGGTTGT ACTTCATAAA TTCCAGAGGT CGAATATACA 1532  
 CCGTTGTCCT CTGAAAAGTT GAACCTCACA CCTGACATGG TGTACGATA GGTATTGTAT 1622  
 AATGCCATTA TATACTTCCA TAAAGTATCC TATGCAATAG AGAACATGTT ATGTGTTAAA 1682  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1703

配列番号 (SEQ ID NO) : 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 6 2 2

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT106

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GAACCATTGA ATCCAATTAA TCTGATTTAT TAAG ATG GCA GGA AAT TCC GAG 52

Met Ala Gly Asn Ser Glu

1

5

GAT ATC AAA GTT CTT GAG AAA TGC CGT GTT GCG CCA CCA CCG GAC GCC 100

Asp Ile Lys Val Leu Glu Lys Cys Arg Val Ala Pro Pro Pro Asp Ala

10

15

20

GTC GCC GAG TTT ACA GTC CCA CTG TCG TTT TTC GAC ATG CGA TGG TTG	148
Val Ala Glu Phe Thr Val Pro Leu Ser Phe Phe Asp Met Arg Trp Leu	
25 30 35	
ATC TCT GAT GCA GAA CAC CAT CTG CAT TTC TAC AGA TTC CGC CAT CCT	196
Ile Ser Asp Ala Glu His His Leu His Phe Tyr Arg Phe Arg His Pro	
40 45 50	
TGT CCC AAC TCT AAA TTT ATC ATT TCA TCC ATT AAA TCG TCC CTT TCC	244
Cys Pro Asn Ser Lys Phe Ile Ile Ser Ser Ile Lys Ser Ser Leu Ser	
55 60 65 70	
CTT GTT CTC AAA CAC TTT CTT CCG TTA GCC GGG AAT TTG ATT TGG CCG	292
Leu Val Leu Lys His Phe Leu Pro Leu Ala Gly Asn Leu Ile Trp Pro	
75 80 85	
GTA GAT TCC TCC GAT AGA ATG CCG GAG TTG CGT TAC AAG AAA GGG GAC	340
Val Asp Ser Ser Asp Arg Met Pro Glu Leu Arg Tyr Lys Lys Gly Asp	
90 95 100	
TCC GTT TCT TTA ACA ATT GCA GAA TCG AGC ATG GAT TTT GAT TAT CTC	388
Ser Val Ser Leu Thr Ile Ala Glu Ser Ser Met Asp Phe Asp Tyr Leu	
105 110 115	
GCC GGA GAT CAT CAG AGG GAT TCT TAT AAA TTC AAC GAT TTG ATT CCG	436
Ala Gly Asp His Gln Arg Asp Ser Tyr Lys Phe Asn Asp Leu Ile Pro	
120 125 130	
CAG CTG CCA GAA CCG ATT GTA ACC TCC GGC GAC GAA GTA TTA CCA CTT	484
Gln Leu Pro Glu Pro Ile Val Thr Ser Gly Asp Glu Val Leu Pro Leu	
135 140 145 150	
TTT GCT TTA CAG GTG ACG GTG TTC TCC AAC ACC GGT ATA TGC ATT GGA	532
Phe Ala Leu Gln Val Thr Val Phe Ser Asn Thr Gly Ile Cys Ile Gly	
155 160 165	

CGC AAT CTT CAT CAA GTT CTT GGT GAT GCC AGT TCT TTT CTG CAT TTT	580
Arg Asn Leu His Gln Val Leu Gly Asp Ala Ser Ser Phe Leu His Phe	
170 175 180	
AAT AAA TTA TGG GTT TTG GTT GAC AAA TCC AAT GGA GAT TCA TTA AAG	628
Asn Lys Leu Trp Val Leu Val Asp Lys Ser Asn Gly Asp Ser Leu Lys	
185 190 195	
TTC CTT CCA CTT TCT TCT CTA CCT ATG TAC GAC AGA TCT GTG GTG CAA	676
Phe Leu Pro Leu Ser Ser Leu Pro Met Tyr Asp Arg Ser Val Val Gln	
200 205 210	
GAT CCA TTT CAT ATT CGT CGA AAA ATC TAC AAT GAA AGA AAA CTG CTC	724
Asp Pro Phe His Ile Arg Arg Lys Leu Tyr Asn Glu Arg Lys Leu Leu	
215 220 225 230	
AAA TCT CAG GGC ACA CCT ACT GTT CTA AAT CCA GCA ATT TCT AAA GAT	772
Lys Ser Gln Gly Thr Pro Thr Val Leu Asn Pro Ala Ile Ser Lys Asp	
235 240 245	
GAA GTT CGA GCC ACC TTC ATC CTA CAC CCT ATT GAT ATC ATG AAG CTC	820
Glu Val Arg Ala Thr Phe Ile Leu His Pro Ile Asp Ile Met Lys Leu	
250 255 260	
AAG AAA TTC ATT TCG TCA AAA AAT CGC AAC TTA ACC GGT AGT AGT AAT	868
Lys Lys Phe Ile Ser Ser Lys Asn Arg Asn Leu Thr Gly Ser Ser Asn	
265 270 275	
TAT AAT CTG TCA ACT TTC ACG GTG ACA TCT GCA CTG ATC TGG ACA TGC	916
Tyr Asn Leu Ser Thr Phe Thr Val Thr Ser Ala Leu Ile Trp Thr Cys	
280 285 290	
TTG TCG AAA TCA TTA GAC ACC GTC GTA AGA GAG AAG GTG GAA GAG GAT	964
Leu Ser Lys Ser Leu Asp Thr Val Val Arg Glu Lys Val Glu Glu Asp	
295 300 305 310	

AAA CAT GCA GCA AAC TTA TGT GCT TTC ATC AAC TGC CGA CAA CGT TTT	1012
Lys His Ala Ala Asn Leu Cys Ala Phe Ile Asn Cys Arg Gln Arg Phe	
315 320 325	
GCT CCG CCG ATA CCT CAA AAT TAC TTT GGA AAT TGC ATA GTG CCT TGT	1060
Ala Pro Pro Ile Pro Gln Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Ile Val Pro Cys	
330 335 340	
ATG GTG GGA TCG ACT CAT GAG CAA CTT GTA GGA AAT GAA GGG TTG TCG	1108
Met Val Gly Ser Thr His Glu Gln Leu Val Gly Asn Glu Gly Leu Ser	
345 350 355	
GTA GCT GCA ACC GCC ATC GGA GAT GCT ATC CAT AAG AGG TTA CAT GAC	1156
Val Ala Ala Thr Ala Ile Gly Asp Ala Ile His Lys Arg Leu His Asp	
360 365 370	
TAC GAA GGA ATT CTG AGA GGA GAT TGG ATA TCG CCG CCC CGA TCA ACA	1204
Tyr Glu Gly Ile Leu Arg Gly Asp Trp Ile Ser Pro Pro Arg Ser Thr	
375 380 385 390	
TCT GCG GCA CCA AGG TCG ACG CTC ATT TAT GTC GTT GGA TCC GCA CAA	1252
Ser Ala Ala Pro Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Val Val Gly Ser Ala Gln	
395 400 405	
CGC AAT GTG CAT GAT TTT GAT GCA GAT TTT GGT TGG GGA AAG CTT GAA	1300
Arg Asn Val His Asp Phe Asp Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Leu Glu	
410 415 420	
AAG CAT GAA TCT GTT TCA ACT AAT CCT TCG GCA ACA CTA ATT TTG ATC	1348
Lys His Glu Ser Val Ser Thr Asp Pro Ser Ala Thr Leu Ile Leu Ile	
425 430 435	
TCT CGG TCC AGA AGA TTT AAA GGA GCA CTT GAG CTT GGC ATT TCT TTG	1396
Ser Arg Ser Arg Arg Phe Lys Gly Ala Leu Glu Leu Gly Ile Ser Leu	
440 445 450	

CCT AAG AAT AGG ATG GAC GCA TTT GCC ACC ATT TTT ACG AAT TTC ATC 1444  
 Pro Lys Asn Arg Met Asp Ala Phe Ala Thr Ile Phe Thr Asn Phe Ile  
 455 460 465 470  
 AAT AGT CTC CAT GTG AGG AGC CCT TTG TAAGAAAAAA GTGCTATCAA 1491  
 Asn Ser Leu His Val Arg Ser Pro Leu  
 475 479  
 TGTATAAAAA AGACAGACAA GTTATGATGC AACAAATGTT TTAGGAGATT ACAAATCCAT 1551  
 GGAAGATGT ATCAAACTCA TCTCTCTATA TATATATATT CAATTGTTTT AAAAAAAAAA 1611  
 AAAAAAAAAA A 1622

配列番号 (SEQ ID NO) : 3

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 6 0 5

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : ペチュニア (Petunia hybrida)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pPAT48

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TGTCGACGAA ATCCATTTCA TTTCCTCTTC TTTCTTGTTT TTCTAATTTT GTCATCATTC 60

TTATCC ATG GCA GGT GAA GTA GCA AAA CAA GAA GTT ACA AAA GTG AAA	108
Met Ala Gly Glu Val Ala Lys Gln Glu Val Thr Lys Val Lys	
1 5 10	
GTC CTG AAA AAA ACA AAC GTG AAA CCA CAT AAA CCA CTA GGA AAA AAA	156
Val Leu Lys Lys Thr Asn Val Lys Pro His Lys Pro Leu Gly Lys Lys	
15 20 25 30	
GAG TGT CAA TTG GTA ACA TTT GAT CTT CCT TAC CTA GCT TTC TAT TAC	204
Glu Cys Gln Leu Val Thr Phe Asp Leu Pro Tyr Leu Ala Phe Tyr Tyr	
35 40 45	
AAC CAA AAA TTT CTC ATC TAT AAA GGT GCT GAA AAC TTT GAC GAG ACG	252
Asn Gln Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Gly Ala Glu Asn Phe Asp Glu Thr	
50 55 60	
GTG GAA AAA ATT AAA GAT GGA CTG GCC TTA GTA TTG GTG GAT TTC TAT	300
Val Glu Lys Ile Lys Asp Gly Leu Ala Leu Val Leu Val Asp Phe Tyr	
65 70 75	
CAA CTA GCT GGG AAA CTT GGA AAA GAT GAA GAA GGG GTT TTC AGG GTG	348
Gln Leu Ala Gly Lys Leu Gly Lys Asp Glu Glu Gly Val Phe Arg Val	
80 85 90	
GAA TAC GAC GAT GAC ATG GAT GGT GTA GAG GTG ACA GTG GCT GTT GCA	396
Glu Tyr Asp Asp Asp Met Asp Gly Val Glu Val Thr Val Ala Val Ala	
95 100 105 110	
GAA GAG ATA GAA GTT GCA GAT CTT ACT GAT GAA GAA GGC ACC ACC AAA	444
Glu Glu Ile Glu Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Glu Gly Thr Thr Lys	
115 120 125	
TTC CAG GAC TTG ATT CCT TGT AAT AAA ATC TTG AAT TTG GAA GGG CTT	492
Phe Gln Asp Leu Ile Pro Cys Asn Lys Ile Leu Asn Leu Glu Gly Leu	
130 135 140	

CAT CGC CCT CTT CTA GCT GTG CAG CTC ACC AAG CTC AAG GAC GGG CTC	540
His Arg Pro Leu Leu Ala Val Gln Leu Thr Lys Leu Lys Asp Gly Leu	
145 150 155	
ACC ATG GGA TTA GCA TTT AAC CAT GCT GTG CTG GAT GGT ACT TCG ACG	588
Thr Met Gly Leu Ala Phe Asn His Ala Val Leu Asp Gly Thr Ser Thr	
160 165 170	
TGG CAC TTT ATG ACC TCG TGG TCC GAG CTT TGC TGT GGG TCC ACC TCA	636
Trp His Phe Met Thr Ser Trp Ser Glu Leu Cys Cys Gly Ser Thr Ser	
175 180 185 190	
ATT TCT GTC CCA CCA TTC CTT GAA CGA ACC AAG GCT CGT AAC ACT CGA	684
Ile Ser Val Pro Pro Phe Leu Glu Arg Thr Lys Ala Arg Asn Thr Arg	
195 200 205	
GTC AAG CTC AAC CTC TCT CAA CCA TCA GAT GCA CCC GAA CAT GCT AAG	732
Val Lys Leu Asn Leu Ser Gln Pro Ser Asp Ala Pro Glu His Ala Lys	
210 215 220	
TCA GCA ACC AAC GGT GAT GTC CCG GCC AAC GTA GAC CCA CCT CTT CGC	780
Ser Ala Thr Asn Gly Asp Val Pro Ala Asn Val Asp Pro Pro Leu Arg	
225 230 235	
GAA AGA GTA TTC AAG TTC TCC GAG TTA GCA ATT GAC AAA ATC AAG TCA	828
Glu Arg Val Phe Lys Phe Ser Glu Leu Ala Ile Asp Lys Ile Lys Ser	
240 245 250	
ACA GTC AAT GCC AAC TCA GGA GAG ACG CCA TTC TCC ACA TTC CAA TCA	876
Thr Val Asn Ala Asn Ser Gly Glu Thr Pro Phe Ser Thr Phe Gln Ser	
255 260 265 270	
CTC TCC GCA CAC GTG TGG CTA GCC GTC ACA CGT GCG CGC CAA CTC AAG	924
Leu Ser Ala His Val Trp Leu Ala Val Thr Arg Ala Arg Gln Leu Lys	
275 280 285	

CCC GAG GAC TAC ACT GTG TAC ACT GTG TTT GCT GAT TGC AGG AAA AGG 972  
 Pro Glu Asp Tyr Thr Val Tyr Thr Val Phe Ala Asp Cys Arg Lys Arg  
 290 295 300  
 GTT GAT CCT CCA ATG CCA GAA AGT TAC TTC GGC AAC CTA ATT CAG GCA 1020  
 Val Asp Pro Pro Met Pro Glu Ser Tyr Phe Gly Asn Leu Ile Gln Ala  
 305 310 315  
 ATT TTC ACA GTG ACC GCG GCA GGT TTG TTA CTA GCA AGC CCG ATC GAG 1068  
 Ile Phe Thr Val Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ser Pro Ile Glu  
 320 325 330  
 TTC GCT GGT GGG ATG ATA CAA CAA GCG ATC GTG AAG CAT GAC GCT AAG 1116  
 Phe Ala Gly Gly Met Ile Gln Gln Ala Ile Val Lys His Asp Ala Lys  
 335 340 345 350  
 GCC ATT GAT GAA AGA AAC AAG GAG TGG GAG AGC AAC CCG AAG ATC TTT 1164  
 Ala Ile Asp Glu Arg Asn Lys Glu Trp Glu Ser Asn Pro Lys Ile Phe  
 355 360 365  
 CAG TAC AAA GAT GCT GGA GTG AAC TGT GTT GCT GTT GGA AGT TCG CCA 1212  
 Gln Tyr Lys Asp Ala Gly Val Asn Cys Val Ala Val Gly Ser Ser Pro  
 370 375 380  
 AGG TTC AAG GTT TAC GAC GTG GAT TTT GGA TGG GGA AAG CCA GAG AGT 1260  
 Arg Phe Lys Val Tyr Asp Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Glu Ser  
 385 390 395  
 GTG AGG AGT GGT TCG AAC AAT AGG TTT GAT GGA ATG GTG TAT TTG TAC 1308  
 Val Arg Ser Gly Ser Asn Asn Arg Phe Asp Gly Met Val Tyr Leu Tyr  
 400 405 410  
 CAA GGC AAA AAT GGA GGA AGA AGC ATT GAT GTG GAG ATT AGT TTG GAA 1356  
 Gln Gly Lys Asn Gly Gly Arg Ser Ile Asp Val Glu Ile Ser Leu Glu  
 415 420 425 430



GCA AAT GCT ATG GAG AGG TTG GAG AAA GAT AAA GAG TTC CTC ATG GAA 1404  
 Ala Asn Ala Met Glu Arg Leu Glu Lys Asp Lys Glu Phe Leu Met Glu  
 435 440 445

ACT GCT TAATTTGCTT AGCTTGGACT CAACTGGCTA CACTTTATTT ATGAGCTGCT 1460  
 Thr Ala

ATGACTCACA TGCATGTATG TTTATTTTTT TTGGAGGGGT TCTTTCCTTT TATTGTTTTTC 1520  
 TATGTTTTTT CTTTCTTGTA CGTTATGAAG AGAAACCGAG TATAAAGGAA TAATGTTTTTC 1580  
 AGTTATTA AAAA AAAAAA AAAAA 1605

配列番号 (SEQ ID NO) : 4

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 4 7 9

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : シソ (Perilla ocimoides)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 葉 (leaf)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pSAT208

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CC GTG ATC GAA ACG TGT AGA GTT GGG CCG CCG CCG GAC TCG GTG GCG 47  
 Val Ile Glu Thr Cys Arg Val Gly Pro Pro Pro Asp Ser Val Ala  
 1 5 10 15

GAG CAA TCG GTG CCG CTC ACA TTC TTC GAC ATG ACG TGG CTG CAT TTT	95
Glu Gln Ser Val Pro Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp Leu His Phe	
20 25 30	
CAT CCC ATG CTT CAG CTC CTC TTC TAC GAA TTC CCT TGT TCC AAG CAA	143
His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr Glu Phe Pro Cys Ser Lys Gln	
35 40 45	
CAT TTT TCA GAA TCC ATC GTT CCA AAA CTC AAA CAA TCT CTC TCT AAA	191
His Phe Ser Glu Ser Ile Val Pro Lys Leu Lys Gln Ser Leu Ser Lys	
50 55 60	
ACT CTC ATA CAC TTC TTC CCT CTC TCA TGC AAT TTA ATC TAC CCT TCA	239
Thr Leu Ile His Phe Phe Pro Leu Ser Cys Asn Leu Ile Tyr Pro Ser	
65 70 75	
TCC CCG GAG AAA ATG CCG GAG TTT CGG TAT CTA TCC GGG GAC TCG GTT	287
Ser Pro Glu Lys Met Pro Glu Phe Arg Tyr Leu Ser Gly Asp Ser Val	
80 85 90 95	
TCT TTC ACC ATC GCA GAA TCT AGC GAC GAC TTC GAT GAT CTC GTC GGA	335
Ser Phe Thr Ile Ala Glu Ser Ser Asp Asp Phe Asp Asp Leu Val Gly	
100 105 110	
AAT CGT CCA GAA TCT CCC GTT AGG CTC TAC AAC TTT GTC CCT AAA TTG	383
Asn Arg Pro Glu Ser Pro Val Arg Leu Tyr Asn Phe Val Pro Lys Leu	
115 120 125	
CCG CCC ATT GTC GAA GAA TCC GAT AGA AAA CTC TTC CAA GTT TTC GCC	431
Pro Pro Ile Val Glu Glu Ser Asp Arg Lys Leu Phe Gln Val Phe Ala	
130 135 140	
GTG CAG GTG ACT CTT TTC CCA GGC CGA GGC GTC GGT ATT GGA ATA GCA	479
Val Gln Val Thr Leu Phe Pro Gly Arg Gly Val Gly Ile Gly Ile Ala	
145 150 155	

ACG CAT CAC ACC GTT AGC GAC GCC CCG TCG TTT CTC GCG TTT ATA ACG	527
Thr His His Thr Val Ser Asp Ala Pro Ser Phe Leu Ala Phe Ile Thr	
160                      165                      170                      175	
GCT TGG TCT TCA ATG AGC AAA CAC ATT GAA AAT GAA GAT GAA GAT GAA	575
Ala Trp Ser Ser Met Ser Lys His Ile Glu Asn Glu Asp Glu Asp Glu	
180                      185                      190	
GAA TTT AAA TCT TTG CCA GTT TTC GAT AGA TCC GTC ATA AAA TAT CCG	623
Glu Phe Lys Ser Leu Pro Val Phe Asp Arg Ser Val Ile Lys Tyr Pro	
195                      200                      205	
ACG AAA TTT GAC TCC ATT TAT TGG AGA AAC GCG CTA AAA TTT CCT TTG	671
Thr Lys Phe Asp Ser Ile Tyr Trp Arg Asn Ala Leu Lys Phe Pro Leu	
210                      215                      220	
CAA TCT CGT CAT CCC TCA TTA CCG ACG GAC CGC ATT CGA ACC ACG TTC	719
Gln Ser Arg His Pro Ser Leu Pro Thr Asp Arg Ile Arg Thr Thr Phe	
225                      230                      235	
GTT TTC ACC CAA TCC AAA ATT AAG AAA TTG AAG GGT TGG ATT CAG TCC	767
Val Phe Thr Gln Ser Lys Ile Lys Lys Leu Lys Gly Trp Ile Gln Ser	
240                      245                      250                      255	
AGA GTT CCA AGT TTA GTC CAT CTC TCA TCT TTT GTA GCG ATT GCA GCT	815
Arg Val Pro Ser Leu Val His Leu Ser Ser Phe Val Ala Ile Ala Ala	
260                      265                      270	
TAT ATG TGG GCT GGC ATA ACG AAA TCA TTC ACA GCA GAT GAA GAC CAA	863
Tyr Met Trp Ala Gly Ile Thr Lys Ser Phe Thr Ala Asp Glu Asp Gln	
275                      280                      285	
GAC AAC GAG GAT GCA TTT TTC TTG ATT CCG GTC GAT CTA AGG CCA CGA	911
Asp Asn Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ile Pro Val Asp Leu Arg Pro Arg	
290                      295                      300	

TTA GAT CCG CCG GTT CCT GAA AAT TAC TTC GGG AAC TGC TTA TCG TAC 959  
 Leu Asp Pro Pro Val Pro Glu Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ser Tyr  
 305 310 315  
 GCG CTG CCG AGA ATG CCG CCG CGA GAG CTG GTG GGA GAG AAA GGG GTG 1007  
 Ala Leu Pro Arg Met Arg Arg Arg Glu Leu Val Gly Glu Lys Gly Val  
 320 325 330 335  
 TTT CTG GCA GCT GAG GTA ATC GCG GCG GAG ATA AAA AAA AGG ATC AAC 1055  
 Phe Leu Ala Ala Glu Val Ile Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Ile Asn  
 340 345 350  
 GAC AAG AGA ATA TTA GAA ACG GTG GAG AAA TGG TCG CCG GAG ATT CGT 1103  
 Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr Val Glu Lys Trp Ser Pro Glu Ile Arg  
 355 360 365  
 AAA GCG TTG CAG AAA TCA TAT TTT TCG GTG GCA GGA TCG AGC AAG CTA 1151  
 Lys Ala Leu Gln Lys Ser Tyr Phe Ser Val Ala Gly Ser Ser Lys Leu  
 370 375 380  
 GAT CTT TAC GGT GCA GAT TTT GGA TGG GGG AAG GCG AGA AAG CAA GAA 1199  
 Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Ala Arg Lys Gln Glu  
 385 390 395  
 ATA TTG TCG ATT GAT GGG GAG AAA TAT GCA ATG ACR CTT TGT AAA GCC 1247  
 Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu Lys Tyr Ala Met Thr Leu Cys Lys Ala  
 400 405 410 415  
 AGG GAT TTC GAA GGA GGA TTG GAG GTT TGC TTG TCT TTG CCT AAG GAC 1295  
 Arg Asp Phe Glu Gly Gly Leu Glu Val Cys Leu Ser Leu Pro Lys Asp  
 420 425 430  
 AAA ATG GAT GCT TTT GCT GCT TAT TTT TCA CTG GGA ATT AAT GGT 1340  
 Lys Met Asp Ala Phe Ala Ala Tyr Phe Ser Leu Gly Ile Asn Gly  
 435 440 446

TAATAAATGT ATGTAATTAA ACTAATATTA TTATGTAACA ATTAATTAAG TGTGAGTAA 1400  
 CGTGAAGAAT AATCCCTATT ATATATTTAT GATTTGGTTC AAATAAAGTG TAAAGCCTCT 1460  
 TGAIAAIAAIAA AIAAIAAIAA 1479

配列番号 (SEQ ID NO) : 5

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 5 0 8

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : サイネリア (Senecio cruentus)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pCAT8

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TG AAC ATT CTC GAA CAT GCC CGA ATA TCG GCC CCC TCG GGC ACC ATC 47

Asn Ile Leu Glu His Ala Arg Ile Ser Ala Pro Ser Gly Thr Ile

1 5 10 15

GGC CAT CGC TCG TTA TCT CTT ACT TTC TTC GAC ATT ACT TGG CTA CTC 95

Gly His Arg Ser Leu Ser Leu Thr Phe Phe Asp Ile Thr Trp Leu Leu

20 25 30

TTC CCT CCG GTC CAC CAT CTT TTC TTC TAT GAC TTT CCA CAT TCT AAA 143

Phe Pro Pro Val His His Leu Phe Phe Tyr Asp Phe Pro His Ser Lys

35 40 45

TCC CAT TTC ATG GAC ACT ATT GTT CCC AGG CTA AAA CAA TCT TTA TCG	191
Ser His Phe Met Asp Thr Ile Val Pro Arg Leu Lys Gln Ser Leu Ser	
50 55 60	
GTC ACT CTT CAA CAT TTT TTC CCG TTT GCT AGT AAT TTG ATT GTA TTT	239
Val Thr Leu Gln His Phe Phe Pro Phe Ala Ser Asn Leu Ile Val Phe	
65 70 75	
CCT AAC ACT GAT GGT TCG GGT TTT AAT AAA AAA CCA GAA ATA AAA CAC	287
Pro Asn Thr Asp Gly Ser Gly Phe Asn Lys Lys Pro Glu Ile Lys His	
80 85 90 95	
GTT GAA GGT GAT TCT GTT GTG GTT ACT TTT GCA GAA TGT TGT CTT GAC	335
Val Glu Gly Asp Ser Val Val Val Thr Phe Ala Glu Cys Cys Leu Asp	
100 105 110	
TTT AAT AAT TTG ACA GGA AAT CAT CCT CGA AAA TGT GAA AAC TTT TAT	383
Phe Asn Asn Leu Thr Gly Asn His Pro Arg Lys Cys Glu Asn Phe Tyr	
115 120 125	
CCA CTT GTA CCT TCA TTG GGA AAT GCA ATC AAA TTA TGT GAT TGC GTC	431
Pro Leu Val Pro Ser Leu Gly Asn Ala Ile Lys Leu Cys Asp Cys Val	
130 135 140	
ACG GTC CCA CTT TTT TCA CTT CAA GTG ACG TTT TTT CCG GGC TCG GGT	479
Thr Val Pro Leu Phe Ser Leu Gln Val Thr Phe Phe Pro Gly Ser Gly	
145 150 155	
ATA TCA CTA GGA ATG ACG AAT CAT CAT AGC CTT GGT GAC GCT AGC ACG	527
Ile Ser Leu Gly Met Thr Asn His His Ser Leu Gly Asp Ala Ser Thr	
160 165 170 175	
CGG TTC AAC TTT TTG AAA GGG TGG ACT TCG ATT ATT CAA TCT GGT GTA	575
Arg Phe Asn Phe Leu Lys Gly Trp Thr Ser Ile Ile Gln Ser Gly Val	
180 185 190	

GAT CGG TCT TTT TTA ACG AAA GGA TCT CCA CCG GTT TTT GAT AGA TTG	623
Asp Arg Ser Phe Leu Thr Lys Gly Ser Pro Pro Val Phe Asp Arg Leu	
195 200 205	
ATT AAC ATC CCA CAT TTA GAT GAA AAT AAG TTG AGA CAT ACA AGG CTC	671
Ile Asn Ile Pro His Leu Asp Glu Asn Lys Leu Arg His Thr Arg Leu	
210 215 220	
GAA AGT TTT TAT AAA CCT TCG AGC CTT GTT GGT CCC ACT GAT AAA GTT	719
Glu Ser Phe Tyr Lys Pro Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Asp Lys Val	
225 230 235	
CGG TCA ACG TTT GTG TTG ACC CGA ACT AAT ATC AAT CTA CTA AAG AAA	767
Arg Ser Thr Phe Val Leu Thr Arg Thr Asn Ile Asn Leu Leu Lys Lys	
240 245 250 255	
AAG GTC TTA ACC CAA GTG CCA AAC TTG GAG TAC ATG TCA TCT TTT ACG	815
Lys Val Leu Thr Gln Val Pro Asn Leu Glu Tyr Met Ser Ser Phe Thr	
260 265 270	
GTA ACT TGT GGT TAT ATA TGG AGT TGC ATA GCG AAA TCA CTC GTA AAA	863
Val Thr Cys Gly Tyr Ile Trp Ser Cys Ile Ala Lys Ser Leu Val Lys	
275 280 285	
ATA GGA GAA AGA AAG GGC GAA GAC GAG TTA GAA CAG TTC ATA ATC ACC	911
Ile Gly Glu Arg Lys Gly Glu Asp Glu Leu Glu Gln Phe Ile Ile Thr	
290 295 300	
ATT GAT TGT CGA TCT CGT CTT GAT CCA CCA ATT CCC ACA GCC TAC TTT	959
Ile Asp Cys Arg Ser Arg Leu Asp Pro Pro Ile Pro Thr Ala Tyr Phe	
305 310 315	
GGT AAC TGT GGT GCA CCA TGT GTC CCG ACC TTA AAA AAT GTC GTT TTG	1007
Gly Asn Cys Gly Ala Pro Cys Val Pro Thr Leu Lys Asn Val Val Leu	
320 325 330 335	

ACT AGC GAA AAT GGG TAT GCA CTT GGT GCT AAA GTA ATT GGA GAG TCT 1055  
 Thr Ser Glu Asn Gly Tyr Ala Leu Gly Ala Lys Val Ile Gly Glu Ser  
 340 345 350  
 ATA TGC AAA ATG ATA TAT AAT AAG GAC GGA ATC TTG AAA GAT GCC GCG 1103  
 Ile Cys Lys Met Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Ile Leu Lys Asp Ala Ala  
 355 360 365  
 AGA TGG CAT GAA CCT TTC ATG ATC CCG GCT AGG AAG ATT GGT GTT GCT 1151  
 Arg Trp His Glu Pro Phe Met Ile Pro Ala Arg Lys Ile Gly Val Ala  
 370 375 380  
 GGT ACA CCT AAG CTC AAC TTG TAC GAC TTT GAT TTT GGG TGG GGG AAG 1199  
 Gly Thr Pro Lys Leu Asn Leu Tyr Asp Phe Asp Phe Gly Trp Gly Lys  
 385 390 395  
 CCG ATA AAG TAT GAG ACT GTT TCA ATA GAC TAT AAT ACG TCG ATT TCT 1247  
 Pro Ile Lys Tyr Glu Thr Val Ser Ile Asp Tyr Asn Thr Ser Ile Ser  
 400 405 410 415  
 ATA AAT GCA AGC AAA ACA TCA GCA CAA GAT CTT GAA ATT GGA TTG AGT 1295  
 Ile Asn Ala Ser Lys Thr Ser Ala Gln Asp Leu Glu Ile Gly Leu Ser  
 420 425 430  
 CTA CCG AGT ATG CAA ATG GAG GCG TTT TCT AGC ATC TTT GAT GAA GGA 1343  
 Leu Pro Ser Met Gln Met Glu Ala Phe Ser Ser Ile Phe Asp Glu Gly  
 435 440 445  
 TTA GAG AGT CAA GTT TCA TTG TAGATCATCG TCCCCTTTT GTGTGCATCA 1394  
 Leu Glu Ser Gln Val Ser Leu  
 450 454  
 AGTTTCTGTC GTTTTATGA GTTGCCACTG TTCTATTCTT TAAGTATAACC TTTGACTAT 1454  
 GTTTTGAAGA TGCAACGATA TAAAATGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1508

配列番号 (SEQ ID NO) : 6



配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 5 2 1

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : ラベンダー (*Lavandula angustifolia*)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pLAT21

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

-TG ACC ACC CTC CTC GAA TCC TCC CGA GTG GCG CCG CCT CCA GGC ACG	47
Xxx Thr Thr Leu Leu Glu Ser Ser Arg Val Ala Pro Pro Pro Gly Thr	
1 5 10 15	
GTG GCT GAG CAG TCA CTC CCG CTC ACC TTC TTC GAC ATG ACG TGG CTG	95
Val Ala Glu Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp Leu	
20 25 30	
CAT TTC CAC CCC ATG CTT CAG CTT CTC TTC TAC GAA CTC CCC TGT TCC	143
His Phe His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr Glu Leu Pro Cys Ser	
35 40 45	
AAA CCC GCC TTC CTC GAA ACC GTC GTT CCG AAA CTC AAA CAA TCC TTA	191
Lys Pro Ala Phe Leu Glu Thr Val Val Pro Lys Leu Lys Gln Ser Leu	
50 55 60	

TCT CTA ACC CTC AAA CAC TTC TTC CCC CTT TCA TGC AAT CTA ATC TAC	239
Ser Leu Thr Leu Lys His Phe Phe Pro Leu Ser Cys Asn Leu Ile Tyr	
65 70 75	
CCT CTA TCG CCG GAG AAA ATG CCG GAG TTC CGG TAT CAG AAC GGT GAC	287
Pro Leu Ser Pro Glu Lys Met Pro Glu Phe Ser Val Ser Phe Thr Ile	
80 85 90 95	
TCG GTT TCT TTC ACG ATT ATG GAG TCT GTC GGA GAT CAT CCG CAT TCC	335
Met Glu Ser Ser Asp Asp Tyr Glu Asp Val Gly Asp His Pro His Ser	
100 105 110	
GCT CAT AAA TAC TAC TGC TTT GCC CCT AGC GAC GAT TAT GAA GAT CTC	383
Ala His Lys Tyr Tyr Cys Phe Ala Gln Leu Pro Pro Ile Val Glu Glu	
115 120 125	
CAG CTG CCG CCG ATA GTC GAG GAA TCT GAT CGG AAA TTG TTT CAA GTT	431
Ser Asp Arg Lys Leu Phe Gln Val Pro Leu Arg Tyr Gln Asn Gly Asp	
130 135 140	
TTA GCC GTG CAA GTG ACT CTG TTT CCC GGT CGC GGG GTG TGC ATC GGA	479
Leu Ala Val Gln Val Thr Leu Phe Pro Gly Arg Gly Val Cys Ile Gly	
145 150 155	
ATA ACG ACG CAC CAC ACC GTT AGC GAT GCT CCA TCG TTT GTA GGG TTT	527
Ile Thr Thr His His Thr Val Ser Asp Ala Pro Ser Phe Val Gly Phe	
160 165 170 175	
ATG AAG AGT TGG GCT TCC ATC ACT AAA TTC GGA GGA GAT GAT GAA TTC	575
Met Lys Ser Trp Ala Ser Ile Thr Lys Phe Gly Gly Asp Asp Glu Phe	
180 185 190	
TTG GAC GGA AAA GGT GAA TGT TTG CCG GTT TTC GAC CGA TCG CTC GTG	623
Leu Asp Gly Lys Gly Glu Cys Leu Pro Val Phe Asp Arg Ser Leu Val	
195 200 205	

AAT TAT CCG CCT AAA TTG GAC ACA TAT TTA TGG AAC AAC GCG CAG AAA	671
Asn Tyr Pro Pro Lys Leu Asp Thr Tyr Leu Trp Asn Asn Ala Gln Lys	
210 215 220	
CGT CCG TTG GAA TCG CAG CAT CCA TCT TTA CCG ACG GAT CGG ATT CGA	719
Arg Pro Leu Glu Ser Gln His Pro Ser Leu Pro Thr Asp Arg Ile Arg	
225 230 235	
GCT ACC TAC CTT TTC ACC CAA TCT GAA ATT AAG AAA TTG AAG GGT TTG	767
Ala Thr Tyr Leu Phe Thr Gln Ser Glu Ile Lys Lys Leu Lys Gly Leu	
240 245 250 255	
ATT CAG AGA AAA GCC CCA AAT GTA GTT AAT CTC TCT TCC TTC GTC GCG	815
Ile Gln Arg Lys Ala Pro Asn Val Val Asn Leu Ser Ser Phe Val Ala	
260 265 270	
ATC GCA GCT TAT ATC TGG ACC GGC ATC GCC AAA TCG GTC GGA GAT TAC	863
Ile Ala Ala Tyr Ile Trp Thr Gly Ile Ala Lys Ser Val Gly Asp Tyr	
275 280 285	
AAA GAC GTG GAT GAC GAC AAA CGC GCT TTC TTT TTA ATT CCG ATC GAT	911
Lys Asp Val Asp Asp Asp Lys Arg Ala Phe Phe Leu Ile Pro Ile Asp	
290 295 300	
TTA AGG CCG CGT TTG GAT CCG CCG GCT CCG GGG AAC TAC TTC GGA AAC	959
Leu Arg Pro Arg Leu Asp Pro Pro Ala Pro Gly Asn Tyr Phe Gly Asn	
305 310 315	
TGT CTA TCG TTT GCG ATG GCG AAG ATC CTC CGG CGG GAT TTG GTC GGA	1007
Cys Leu Ser Phe Ala Met Ala Lys Ile Leu Arg Arg Asp Leu Val Gly	
320 325 330 335	
GAT GAA GGG GTC TTT CCG GCA GCT GAG GCG ATC GCG GCG GAA ATA GAG	1055
Asp Glu Gly Val Phe Arg Ala Ala Glu Ala Ile Ala Ala Glu Ile Glu	
340 345 350	

AAG AGG ACG AGC GAC AAG AAG ATT CTA GAA ACT GTG GAG AAC TGG CCG 1103  
Lys Arg Thr Ser Asp Lys Lys Ile Leu Glu Thr Val Glu Asn Trp Pro  
355 360 365

TCT GAG ATT CGC GAA GCC TTG CAA AAC TGT TAT TTC TCG GTG GCG GGA 1151  
Ser Glu Ile Arg Glu Ala Leu Gln Asn Cys Tyr Phe Ser Val Ala Gly  
370 375 380

TCG AGC AGG CTT GAT CTT TAC GGC GCG GAT TTT GGA TGG GGT AAG GCG 1199  
Ser Ser Arg Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Ala  
385 390 395

GTG AAG CAA GAG ATA CTG TCG ATT GAT GGA GAG AAG TTT ACG ATG TCG 1247  
Val Lys Gln Glu Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu Lys Phe Thr Met Ser  
400 405 410 415

TTG TGT AAA CCG AGG GAT GCT GCC GGA GGA TTG GAG GTT GGA TTG TCT 1295  
Leu Cys Lys Pro Arg Asp Ala Ala Gly Gly Leu Glu Val Gly Leu Ser  
420 425 430

TTG CCA AAG GAG GAA TTG CAA GCT TTT GAT GAT TAT TTT GCG GAG GGA 1343  
Leu Pro Lys Glu Glu Leu Gln Ala Phe Asp Asp Tyr Phe Ala Glu Gly  
435 440 445

ATA AAG GGT TGATTAATCA TTTAATCATG TATTATGAAG TTGGATGAAA 1392  
Ile Lys Gly  
450

TCCTCTGTTT CATCTCTATT GTTTAAACAA TAATTTTTTTT CCATTGAACT TTTTGTGAGTC 1452  
AATAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAATG AAAAAACTCA GTTATTTTTTT TTTTTTTTTT 1512  
TTTTTTTTTT 1521

配列番号 (SEQ ID NO) : 7

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 10

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Arg Phe Leu Gly Ile Thr Gly Ser Pro Lys

1 5 10

配列番号 (SEQ ID NO) : 8

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 8

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 9

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 10

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Gly Val Glu Ile Gly Val Ser Leu Pro Lys

1 5 10

配列番号 (SEQ ID NO) : 10

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 8

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Ala Ser Leu Ser Leu Thr Leu Lys

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 4

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

His Tyr Val Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile Lys

1 5 10

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 4

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Val Arg Ala Thr Tyr Val Leu Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys

1 5 10

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 3

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 8

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 4

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 9

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 5

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 8

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 6

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 3

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

AARATHCAYA TGGAYGCITT YGC

23

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 7

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 3

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CTCGAGTTTT TTTTTTTTTT TTT

23

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 8

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 6

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TTCACCATGG AGCAAATCCA AATGGT

26

配列番号 (SEQ ID NO) : 1 9

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 7

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)



鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CGAGTCGCCC TCATCAC

17

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 0

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 6

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

AACAGCTATG ACCATG

16

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 6

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : peptide

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

Asp Phe Gly Trp Gly Lys

1

5

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 7

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GAYTTYGGIT GGGGIAA

17

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 3

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 1

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TGGCAACTGT CTTGCGTCAT G

21

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 4

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 3

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CCATGTCAGG TGTGAGGTTC AAC

23

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 5

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 0

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

ATCGTTTCGC ATGATTGAAC

20

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 6

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 0

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA

20

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 7

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 5 3

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GGGATCCAAC A ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG GCC GTG ATC GAA ACG TGT

50

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Ala Val Ile Glu Thr Cys

1

5

10

AGA

53

Arg

15

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 8

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1 6

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GTAAAACGAC GGCCAT

16

配列番号 (SEQ ID NO) : 2 9

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 4 5

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

GGGATCCAAC A ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAC ATT CTC GAA C

45

Met Glu Gln Ile Gln Met Val Asn Ile Leu Glu

1

5

10

配列番号 (SEQ ID NO) : 3 0

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 2 1

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 一本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

CTCGGAGGAA TTCGGCACGA C

21

配列番号 (SEQ ID NO) : 3 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 3 5

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : synthetic DNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

AGTCGGATCC AACA ATG ACC ACC CTC CTC GAA TCC

35

Thr Thr Leu Leu Glu Ser

1

5

## 請 求 の 範 囲

1. 芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質又は該酵素活性を有する誘導体をコードする遺伝子。

2. 配列番号：21に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列をプライマーとして用いてクローニングすることにより得られる請求項1記載の遺伝子。

3. 前記プライマーが配列番号22に記載の塩基配列を有するプライマーである請求項2記載の遺伝子。

4. 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、除去又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列をコードする請求項1又は2に記載の遺伝子。

5. 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部又は全部に対して、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ の条件下でハイブリダイズすることができ、且つ芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする、請求項1又は2に記載の遺伝子。

6. 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部又は全部に対して、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ の条件下でハイブリダイズすることができ、且つ芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする、請求項1又は2に記載の遺伝子。

7. 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも15%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする、請求項1又は2に記載の遺伝子。

8. 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも30%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ芳

香族アシル基転移活性を有する蛋白質をコードする、請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子。

9. 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んで成るベクター。

10. 請求項 9 に記載のベクターにより形質転換された宿主。

11. 前記宿主が微生物又は動物細胞である請求項 10 に記載の宿主。

12. 前記宿主が植物細胞又は植物体である請求項 10 に記載の宿主。

13. 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によりコードされる蛋白質。

14. 植物体の粗酵素抽出液をシバクロンブルー 3 GA を固定した樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより処理して得られる、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質。

15. 請求項 13 又は 14 に記載の蛋白質に対する抗体と特異的に結合することができ、且つ、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質。

16. 請求項 10 に記載の宿主を培養し、又は成育させ、そして該宿主から、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

17. 植物体の粗酵素抽出液をシバクロンブルー 3 GA を固定した樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより処理することを特徴とする、芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質の製造方法。

18. 芳香族アシル基転移活性を有する蛋白質の製造方法において、請求項 13 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対する抗体と特異的に結合することを含むことを特徴とする方法。

19. 色素のアシル化方法であって、請求項 13 ～ 15 のいずれか 1 項

に記載の蛋白質を色素に作用せしめることを特徴とする方法。

20. 植物体内における色素のアシル化方法であって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体内に導入し、該遺伝子を発現せしめ、そして生成した蛋白質により植物体内の色素をアシル化することを特徴とする方法。

21. 色素の安定化方法であって、請求項 13～15のいずれか 1 項に記載の蛋白質を作用させて色素をアシル化することを特徴とする方法。

22. 植物体内における色素の安定化方法であって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体内に導入し、該遺伝子を発現せしめ、そして生成した蛋白質により植物体内の色素をアシル化することを特徴とする方法。

23. 植物の花色調節方法であって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体内に導入し、該遺伝子を発現せしめ、そして生成した蛋白質により植物体内の色素をアシル化することを特徴とする方法。

24. 色素がアントシアニンである請求項 19～23のいずれか 1 項に記載の方法。

25. 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入されており、色が調節された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫又はそれらの組織。

26. 前記組織が花である、請求項 25 記載の植物の組織。

27. 請求項 25 記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切花。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00348

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/54, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL, GENETYX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Phytochemistry (Oxford) Vol. 35(6) 1994 Javelle F. et al. "Formation of omega-feruloyloxypalmitic acid by an enzyme from wound-healing potato tuber discs" p. 1419-1424	1 - 27
A	Phytochemistry (Oxford) Vol. 32(1) 1993 Murakoshi I. et al. "Acyltransferase for lupin alkaloids in lupinus-hirsutus" p. 87-91	1 - 27
A	Plant Physiol (BETHESDA) Vol. 98(4) 1992 Javelle F. et al. "Purification and properties of putrescine hydroxycinnamoyl transferase from tobacco nicotiana-tabacm cell suspensions" p. 1264-1269	1 - 27
A	Phytochemistry (Oxford) Vol. 31(3) 1992 Macheix J-J et al. "Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl coA transferase from apple and date fruits" p. 767-772	1 - 27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.<sup>a</sup> Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 14, 1996 (14. 05. 96)

Date of mailing of the international search report

May 21, 1996 (21. 05. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00348

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Phytochemistry(Oxford) 30(8) 1991 Negrel J. et al. "Tyramine hydroxycinnamoyl transferase in the roots of wheat and barley seedlings" p. 2519-2522	1 - 27
A	Phytochemistry(Oxford) Vol. 30(5) 1991 Witte L. et al. "Quinolizidine alkaloids and the enzymatic syntheses of their cinnamic and hydroxycinnamic acid esters in lupinus-angustifolius and lupinus-luteus" p. 1493-1498	1 - 27
A	Phytochemistry(Oxford) Vol. 22(11) 1983 "Agmatine coumaroyl transferase EC-2.3.1. - from barley hordeum-vulgare seedlings" p. 2401-2404	1 - 27
A	Phytochemistry Vol. 19(8) 1980 Zenk M. H. et al. "Partial purification and properties of hydroxy cinnamoyl transferase from higher plants" p. 1625-1630	1 - 27
A	Nature Vol. 366, 1993 Edwina C. Corinish et al. "Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour" p. 276-279	1 - 27
A	JP, A, 6-500239 (Int Flower dev. pty. Ltd.), January 31, 1994 (13. 01. 94) & EP, A, 522880 & US, A, 5349125	1 - 27

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.cl<sup>9</sup> C12N15/54 C12N9/10 C12N1/21 C12N5/00 A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.cl<sup>9</sup> C12N15/54 C12N9/10 C12N1/21 C12N5/00 A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL, GENETYX

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Phytochemistry(Oxford) 第35巻(6) 1994 Javelle F. et al 「Formation of omega-feruloyloxypalmitic acid by an enzyme from wound-healing potato tuber discs」 p. 1419-1424	1-27
A	Phytochemistry(Oxford) 第32巻(1) 1993 Murakoshi I. et al 「Acyltransferase f or lupin alkaloids in lupinus-hirsutus」 p. 87-91	1-27
A	Plant Physiol(BETHESDA) 第98巻(4) 1992 Javelle F. et al 「Purification and p roperties of putrescine hydroxycinnamoyl transferase from tobacco nicotiana- tabacm cell suspensions」 p. 1264-1269	1-27
A	Phytochemistry(Oxford) 第31巻(3) 1992 Macheix J-J et al 「Partial purificatio n and characterization of hydroxycinnamoyl coA transferase from apple and da te fruits」 p. 767-772	1-27
A	Phytochemistry(Oxford) 30(8) 1991 Negrel J. et al 「Tyramine hydroxycinnamoy l transferase in the roots od wheat and barley seedlings」 p. 2519-2522	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 05. 96

国際調査報告の発送日

21.05.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷口博

印

4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Phytochemistry(Oxford) 第30巻 (5) 1991 Witte L. et al 「Quinolizidine alkaloids and the enzymatic syntheses of their cinnamic and hydroxycinnamic acid esters in lupinus-angustifolius and lupinus-luteus」 p. 1493-1498	1-27
A	Phytochemistry(Oxford) 第22巻(11) 1983 「Agmatine coumaroyl transferase EC-2.3.1.- from barley hordeum-vulgare seedlings」 p. 2401-2404	1-27
A	Phytochemistry 第19巻 (8) 1980 Zenk M.H. et al 「Partial purification and properties of hydroxy cinnamoyl transferase from higher plants」 p. 1625-1630	1-27
A	Nature 第366巻 1993 Edwina C. Corinish et al 「Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour」 p. 276-279	1-27
A	JP, A, 6-500239 (Int Flower dev.pty. LTD) 13. 1月. 1994(13. 01. 94) & EP, A, 522880, US, A, 5349125	1-27